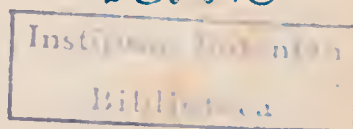
# MEMÓRIAS
## DO
# INSTITUTO BUTANTAN

1947

TOMO XX

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

As "MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" são destinadas á publicação de trabalhos realizados no Instituto ou com sua contribuição. Os trabalhos são dados á publicidade, separadamente, logo após a entrega e reunidos anualmente num volume.

Serão fornecidas, a pedido, separatas dos trabalhos publicados nas "Memorias", pedindo-se nesse caso o obsequio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

---

Toda a correspondencia editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa postal 65
S. Paulo — BRASIL

---

PEDE-SE PERMUTA

EXCHANGE DESIRED

# INDICE

# FEBRE MACULOSA NO MÉXICO. CULTIVO DE RIQUÉTSIAS

POR A. VALLEJO-FREIRE

*(Do Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)*

Em trabalhos anteriores (1-2) estudamos o comportamento experimental do virus isolado por Bustamente e Varela (3-6) de casos humanos de uma infecção exantemática, semelhante à febre maculosa, verificada nos Estados de Sinaloa e Sonora, no México.

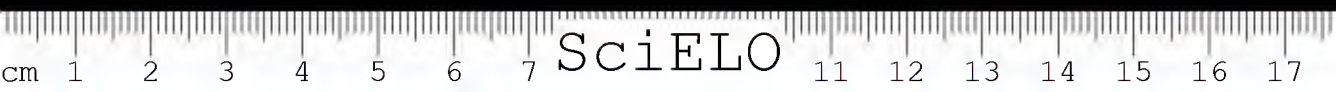
Em vista de serem conseguidas a partir de cultivo em tecidos vacinas eficazes contra a maioria das riquétsioses humanas, procuramos cultivar a amostra do virus mexicano, para obter antigeno em quantidade suficiente, assim como estudar o comportamento das riquétsias cultivadas.

Entre as técnicas utilizadas para êsse fim, sobressai pela simplicidade e melhores resultados obtidos a originalmente usada por Barykine e colaboradores (7) no cultivo do virus do tifo epidêmico. Consiste esta técnica em inocular o material infetante no interior da bolsa vitelina de embriões de galinha em desenvolvimento. O método foi aperfeiçoado por Cox (8,9), que o utilizou para cultivar riquétsias tanto do grupo do tifo, como do da febre maculosa e é hoje internacionalmente conhecido sob a denominação de método de Cox.

Com o método de Cox diversos pesquisadores conseguiram cultivar riquétsias isoladas de casos humanos de infecções exantemáticas, verificados nas mais variadas localidades geográficas (10-15), o que permitiu igualmente produzir vacinas eficazes contra as diferentes riquétsioses observadas nos continentes europeu e americano (16-19).

Durante a última guerra a proteção das tropas e mesmo de grandes populações contra o tifo epidêmico e endêmico e mesmo contra a febre maculosa foi possivel devido à utilização da técnica de Cox para o cultivo de riquétsias, que permitiu a produção de vacinas em grande escala. Com os métodos de Weigl (20), Zinsser e colaboradores (21-24), Castañeda (25) ou Spencer-Parker (26) não

---

Recebido para publicação em outubro de 1945.

teria sido possivel produzir antigenos necessarios para a produção de grandes volumes de vacinas, pois que todos êles são de difícil execução, requerendo pessoal altamente especializado.

As amostras de vírus da febre maculosa isoladas no continente americano, principalmente nos Estados Unidos e no Brasil, são todos cultiváveis pelo método de Cox e a grande maioria das vacinas hoje utilizadas é preparada com antígenos obtidos por esta técnica.

Neste trabalho relatamos resultados de cultivo de uma amostra do vírus mexicano, que temos utilizado no Instituto Butantan para a produção de vacina contra a febre maculosa em São Paulo. Descrevemos com detalhe o material e a técnica por nós empregados com bons resultados há algum tempo, o que nos tem permitido maior segurança nas manipulações assépticas e diminuição do número de contaminações bacterianas, principalmente durante a fase de inoculação e colheita dos embriões.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Ovos* — Ovos fecundados de galinha Leghorn, mantidos em incubadora comum à temperatura de 38.5 a 39.5°C durante 5 a 8 dias.

*Virus B. V.* (*) — Isolado de caso de febre maculosa no México por Bustamante e Varela. Remetido ao Instituto Butantan em *Ornithodorus* sp. e mantido em passagens sucessivas em cobáia.

*Inoculação* — As inoculações são feitas com auxílio de seringas montadas com agulhas de 3 a 4 cm de comprimento e 0.3 a 0.5 mm de diâmetro.

Os embriões antes de inoculados são examinados por transiluminação. Nesta ocasião assinala-se na casca os limites da câmara-de-ar e marca-se o local, que corresponde ao ponto mais próximo da mancha ocular. Esta última referência facilitará ao técnico atingir o interior da bolsa vitelina no momento da inoculação.

Para facilitar a inoculação, usa-se um maçarico alimentado com mistura de oxigênio e acetileno (oxy-acetileno blow-pipe Oswald, tipo W-29, bico N.° 2), que permite formar chama bem fina, curta e intensa. Com êste maçarico calcina-se em um segundo pequena área da casca, correspondente à câmara-de-ar, aproximando a base da chama tangencialmen-

(*) Recebido por gentileza do prof. Ayrosa Galvão.

te à parte mais saliente do polo do ovo (Foto 1). Dêste modo, não só se esteriliza, como se torna friável o local por onde vai passar a agulha para atingir, através da câmara-de-ar, o saco da gema, evitando a manobra de se perfurar a câmara-de-ar com estilete, o que é a causa frequente de contaminações.

As inoculações de ovo a ovo foram feitas em volume, variando de 0.1 a 0.5 cm³ da suspensão obtida de u'a membrana vitelina em 15 a 20 cm³ de líquido.

Com a seringa contendo o material infetante, com golpe brusco, procura-se orientar a agulha através da parte calcinada da casca, aproximadamente para o centro do ovo e no lado oposto da marca correspondente à mancha ocular, procurando evitar movimentos laterais, que podem dilacerar a membrana da casca, que protege e forma a câmara-de-ar. Dêste modo, atinge-se facilmente o interior do saco da gema, porém, para maior segurança, convém, antes de injetar o "inoculum", aspirar pequeno volume de gema.

Foto 1

Inoculado o material, o orifício feito pela agulha é fechado com u'a mistura de parafina fundida (ponto de fusão 70°C) ou gutapercha em bastões, idêntica à utilizada pelos dentistas.

Podem-se inocular vários ovos com a mesma seringa, usando-se neste caso seringas de 5 cm³ de capacidade para inocular no máximo 10 ovos. De cada "inoculum" ou, melhor, com material usado em cada seringa, procede-se, antes das inoculações, a provas de esterilidade bacteriológica, para afastar a hipótese de eventuais contaminações, semeando algumas gotas em caldo glicosado.

*Incubação* — Os embriões inoculados permanecem em incubadora ou estufa apropriada na temperatura de 34 a 35°C, até que se verifique a morte ou quando observados por transiluminação, mostrarem movimentos tão lentos, apenas perceptíveis que indiquem estar no limite da vitalidade.

*Abertura* — Antes de se proceder à abertura dos ovos para retirada dos embriões, desinfeta-se por meio de tintura de iodo a parte da casca correspondente à câmara-de-ar até 1 cm abaixo de seus limites previamente assinalados.

A técnica que vimos utilizando com bons resultados para a abertura asséptica dos embriões é a de Penna (27) modificada. Como suporte dos ovos usamos uma caixa metálica, cuja parte superior é constituida por uma chapa de aço inoxidável, por onde passam quatro pinos, que servem para encaixar os recipientes dos ovos. No interior da caixa um motor idêntico aos utilizados nas vitrolas, permite fazer girar os suportes dos ovos com velocidade regulável por um "dial" graduado entre 50 a 150 r.p.m.; rotineiramente, usa-se 70 r.p.m. (Foto 2).

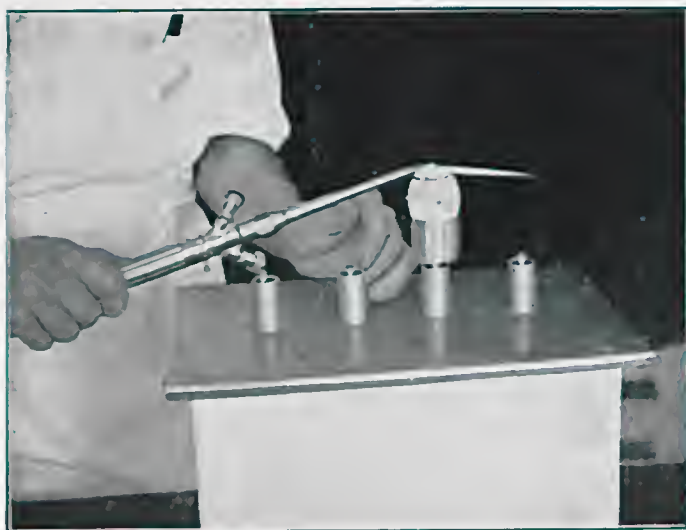



Foto 2

Colocados os ovos nos suportes e com a câmara-de-ar mantida para cima, antes de acionar o motor, com auxílio do maçarico, utilizando sempre a base da chama, calcina-se novamente um pequeno ponto da parte superior da casca. Com esta manobra evita-se que, ao aplicar a chama para abrir o ovo, a dilatação do ar na câmara provoque a saída violenta do material infetado.

Ligado o motor e girando os ovos a 70 r.p.m., aproxima-se a base da chama tangencialmente à parte lateral do ovo, próximo e pouco acima do limite previamente marcado da câmara-de-ar. Em 2 a 3 segundos ao máximo, isto é, completadas duas a quatro rotações, "corta-se" estérilmente a parte da casca correspondente à câmara-de-ar, que se pode remover facilmente, deixando ainda a membrana da casca protegendo o embrião. Com auxílio

de pinça esta pode ser retirada, para se proceder à colheita do embrião ou apenas da membrana do saco da gema, removendo-a para recipiente estéril, onde com maior segurança se poderá trabalhar ao abrigo de contaminações (Foto 3).

Foto 3

Com esta técnica, a chama capaz de abrir o ovo não chega a provocar aumento apreciável de temperatura ao embrião, não influindo, portanto, sôbre a viabilidade do vírus nêle cultivado. Com precaução, no entanto, pode-se, antes de abrir os ovos, mantê-los por algum tempo na geladeira.

*Coloração de riquétsias* — As preparações para a pesquisa de riquétsias foram feitas de esfregaços tão finos quanto possível de fragmentos de tecido da membrana vitelina ou ainda da suspensão resultante do triturado pronto para ser inoculado nos embriões.

Para coloração foi usado o método de Macchiavello (28).

Foto 4

## RESULTADOS

Tentamos cultivar o agente da febre maculosa no México a partir de sangue, suspensões de tecido cerebral ou triturado de vaginais de cobáias infetadas.

Foram bem sucedidas as séries de passagens em embriões, iniciadas com 0.5 a 1.0 cm³ de virus-sangue, colhido no primeiro ou segundo dia de circulação do virus.

Conseguimos culturas positivas de uma série iniciada com material proviniente de emulsão de tecido cerebral de cobáia infetada.

As tentativas de cultivo feitas com suspensões contendo riquétsias, obtidas de "tunica vaginalis", raspagem ou lavagem da parede do peritôneo parietal de cobáias infetadas, não foram levadas adiante, por terem sido verificadas contaminações bacterianas, devidas, provávelmente, às manobras durante a colheita

Nas passagens de embrião a embrião, foram utilizadas membranas vitelinas de embriões infetados, colhidas no dia da morte, trituradas logo a seguir ou após permanência no frigorifico (temperatura entre 6 e 10.°C) durante algumas horas ou mesmo 2 a 3 dias, em certas ocasiões.

As membranas foram lavadas em solução fisiológica ou em sôro de leite fresco descremado, congeladas, trituradas, suspensas em sôro de leite, centrifugadas a baixa rotação durante tempo apenas suficiente para remover as partículas mais grosseiras do tecido. O líquido sobrenadante foi utilizado para inocular a série seguinte de embriões.

Em duas séries iniciadas com inoculação de virus-sangue citratado encontramos riquétsias em número elevado logo nas primeiras passagens. Em uma destas séries foram feitas 12 passagens e na outra apenas 7. Nesta segunda série perdemos o material devido a desarranjo havido na estufa de manutenção dos embriões inoculados e na primeira interrompemos voluntáriamente o trabalho após doze passagens consecutivas em embriões.

Para cada "inoculum" preparado com membrana de um único embrião, injetamos como minimo 5 outros. De cada série por vezes utilizamos membranas de 2 ou 3 embriões. As membranas que apresentaram maior riqueza de crescimento foram as escolhidas para serem utilizadas na manutenção da amostra.

Em ambas as séries os embriões inoculados com virus-sangue morreram entre o 7.° e 9.° dia, não levando em conta os mortos antes de decorridas 48 horas da inoculação. Em todos os embriões examinados não verificamos a presença de riquétsias, apesar de cuidadoso e demorado exame das preparações.

Na primeira passagem de embrião a embrião, a morte verificou-se entre o 6.° e 8.° dia e nas demais, quando o "inoculum" foi positivo, entre o 4.° e 6.° dia.

Nas membranas vitelinas dos embriões que serviram para a primeira passagem da série mais longa de inoculações, encontramos riquétsias em número regular em todos os que morreram no 6.º dia e em um morto no 8.º dia. Foram igualmente encontradas riquétsias em número abundante em todos os embriões logo na primeira passagem. O aspecto e a abundância das riquétsias foram praticamente semelhantes aos verificados na passagem seguinte. Sómente a partir da 6.ª passagem e excepcionalmente em alguns embriões obtivemos membranas mais ricas em riquétsias.

Mais frequentemente encontramos crescimento abundante nos embriões mortos entre o 4.º e 6.º dia, sendo raras as vezes em que verificamos riquétsias em grande número nos mortos depois do 7.º dia. Nunca observamos crescimento em embriões mortos antes de decorridas 72 horas da inoculação, sendo nestes casos até mesmo raro encontrar riquétsias extracelulares, correspondentes ao material inoculado.

As duas fotografias apresentadas (Foto 5-6) foram obtidas: uma de preparação feita com membrana da gema de embrião inoculado com material de 11.ª passagem e de embrião morto entre o 5.º e o 6.º dia de inoculação; a outra corresponde a material de 6.ª passagem.

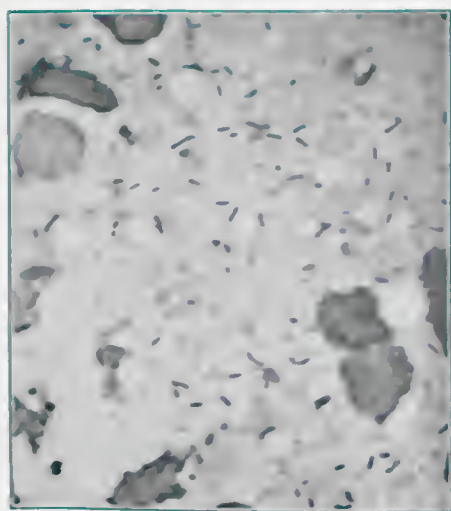



Foto 5

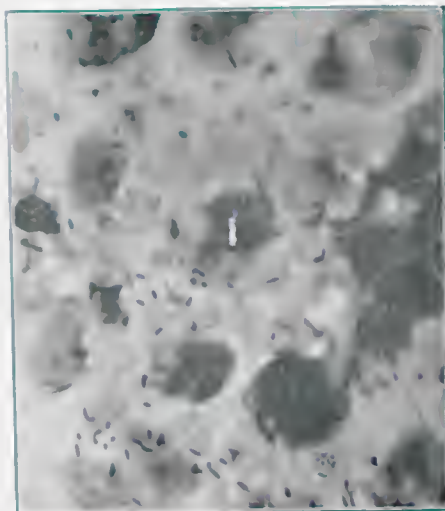



Foto 6

São bem visiveis em ambas as fotografias riquétsias situadas intraprotoplasmaticamente e também outras nos espaços intercelulares. Quer com a técnica de coloração de Macchiavello, quer com a de Giemsa, não conseguimos localizar riquétsias de situação intranuclear.

Quanto à forma, predomina a de pequenos bastonetes e de diplobacilo, com elementos mais raros com aspecto de diplococos. O polimorfismo das riquétsias nas culturas em embriões não é tão grande, quanto o que se verifica nas preparações de material de cobáias infetadas, que apresentam variações mais amplas e principalmente formas de bastonetes de maiores dimensões.

As observações feitas em cobáia depois de inoculadas com membranas de embriões infetados de culturas correspondentes até a 12.ª passagem, mostraram que as caracteristicas originais do vírus mexicano foram integralmente mantidas, inclusive a capacidade de provocar intensas reações escrotais em animais inoculados, quer seja pela via subcutânea, quer pela via peritoneal.

Em membranas de embriões, que após a morte foram mantidos por 2 a 4 dias à temperatura ambiente do laboratório, encontramos algumas vezes maior número de riquétsias do que em membranas de embriões da mesma série, abertos imediatamente após a morte. No entanto, tivemos dificuldade de manter séries, quando utilizamos membranas vitelinas de embriões mantidos depois de mortos à temperatura ambiente do laboratório. Cobáia, porém, inoculadas com material dêstes embriões, poucas vezes reagiram positivamente, mostrando assim que as riquétsias estavam mortas. Quando, entretanto, 12 a 15 dias depois foram reinoculadas com 1 $cm^3$ de vírus-sangue de passagem em cobáia, quase todos os animais se apresentaram imunes.

## CONCLUSÕES

A amostra de virus BV é facilmente cultivada pela técnica de Cox.

Não foram notadas diferenças significativas entre o comportamento dos embriões inoculados com amostra de vírus mexicano e os inoculados com vírus de outras procedências. Apenas verificamos a maior facilidade com que são encontradas as riquétsias logo na primeira passagem de embrião a embrião, fato este, que parece ocorrer com menos frequência com riquétsias isoladas de casos de febre maculosa no Brasil e nos Estados Unidos. Com as outras amostras de vírus da febre maculosa até hoje estudadas, só se observam riquétsias em número razoável a partir da 4.ª passagem e por vezes o crescimento só é abundante, quando atinge a 6.ª ou 7.ª passagem. Com esta amostra, na 1.ª e 2.ª passagem podem-se encontrar com relativa facilidade riquétsias nas preparações feitas com membranas vitelinas em número suficiente para serem encontradas em todos os campos das melhores preparações.

O cultivo do vírus mexicano permitirá obter facilmente vacinas contra a febre maculosa no México. A identidade imunológica existente entre este vírus e os da febre maculosa nas Montanhas Rochosas e no Brasil

(S. Paulo e Minas Gerais), aliada à facilidade de cultivo da amostra mexicana, leva a sugerir a sua utilização no preparo das vacinas contra a febre maculosa verificada em diversos países do continente americano (Estados Unidos, Brasil, Colombia e México).

RESUMO

São descritos os métodos e detalhes da técnica utilizada para o cultivo, de u'a amostra de vírus da febre maculosa isolada no México e apresentados os resultados alcançados.

Foram conseguidas culturas positivas a partir de vírus-sangue de cobáia infetada, fazendo-se neste trabalho uma série de 12 passagens em embriões. As caracteristicas do vírus, quanto ao comportamento em relação à infecção provocada na cobáia, foram integralmente mantidas.

Já na 1.ª passagem, ao contrario do que se verifica com as demais amostras de vírus da febre maculosa, as riquètsias podem ser vistas em grande número na membrana vitelina dos embriões inoculados. O número de riquétsias encontradas a partir da 5.ª passagem é muito superior ao que tem sido verificado em outras amostras de febre maculosa.

O autor é de opinião que, devido à facilidade com que se cultiva esta amostra, pode ser a de escolha para o preparo de vacinas contra a febre maculosa em geral, visto que, como ficou provado em trabalho anterior, ela é imunológicamente idêntica à febre maculosa no Brasil e nos Estados Unidos.

ABSTRACT

The methods and details are described of the technique used for the cultivation, by Cox' method, of a strain of spotted fever virus, isolated in México by Bustamente and Varela of a human case of the disease, and the results presented.

Positive cultures were secured from virus-blood of infected guinea-pig, a series of twelve passages in chicken embryos being made. The virus' characteristics as to its behaviour in regard to experimental infection in guinea-pig, were entirely maintained.

Already in the first passage a considerable number of Rickettsiae could be found in the yolk sac of the inoculated embryos, which is in contrast with what happens with other strains of spotted fever viruses. The number of Rickettsiae observed from the fifth passage on is much higher than that seen in other spotted fever strains.

Due to the easy cultivation of this strain, the author suggests its use for the preparation of vaccines against all spotted fevers, since immunologically it is identical to that of the spotted fever in Brazil and in the Rocky Mountains (U. S. A.) as has been proven in a former paper.

Agradecemos ao Sr. Arnaldo França o auxilio técnico prestado na execução dêste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. *Vallejo-Freire, A.* — Estudo experimental do vírus da nova riquétsiose verificada no México, *Mem. Inst. Butantan*, **20**, em publicação.

2. *Vallejo-Freire, A.* — Transmissão da riquétsiose mexicana verificada nos Estados de Sonora e Sinaloa, por ixodidas do gênero *Amblyomma*, *Mem. Inst. Butantan*, **20**, em publicação.

3. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Una nueva rickettsiosis in México. Existencia de la fiebre manchada americana en los Estados de Sinaloa e Sonora, *Rev. Inst. Salubr. y Enf. Trop.*, **4**:189-210, 1943.

4. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Caracteristicas de le fiebre manchada de las Montanhas Rocosas en Sonora y Sinaloa, México, *Rev. Inst. Salubr. y Enf. Trop.*, **5**:129-136, 1944.

5. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Aislamiento de una cepa de fiebre manchada identica a la de las Montañas Rocosas en Sinaloa, México, *Bol. Ofic. San. Panam.*, **23**:117-118, 1944.

6. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Estudio estadistico de dos cepas mexicanas de fiebre manchada, *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, **5**:187-196, 1944.

7. *Barykine, W.; Kompanecz, A.; Botcharowa, A. & Bauer, H.* — Nouvelle methode de culture du virus du typhus exanthematique, *Office Inter. d'Hyg. Publique (Bulletin Mensuel)*, **30**:326-331, 1938.

8. *Cox, H. R.* — Use of yolk sac developing chick embryo as medium for growing Rickettsiae of Rockey Mountain Spotted Fever and typhus groups, *Public Health Reports*, **53**:2241-2247, 1938.

9. *Cox, H. R.* — Cultivation of Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever typhus and Q-fever groups in embryonic tissues of developing chicks, *Science*, **94**:39-403, 1941.

10. *Cox, H. R.* — The cultivation of *Rickettsiae diaporica* in tissue culturee and in the tissues of developing chick embryos, *Public Health Reports*, **54**:2171-2178, 1939.

11. *Tchang, J. & Mathews, G. B.* — Culture of Rickettsiae of Chinese typhus in yolk sac of developing chick embryo, *Chinese Med. J.*, **57**:47-50, 1940.

12. *Travassos, J. & Vallejo-Freire, A.* — Cultivo em série da riquétsia da febre maculosa em São Paulo na membrana da gema de embriões de galinha, *Rev. Biologia e Higiene*, **11**:101-102, 1940.

13. *Pang, K. H. & Zia, S. H.* — Studies on typhus Rickettsiae cultivated in yolk sac of developing chick, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **45**:76-78, 1940.

14. *Gildemeister, E. & Haagen, E.* — Fleckfieberstudien; über die Züchtung der *Rickettsia mooseri* und der *Rickettsia prowazeki* im Dottersack des Hühnereies und über die Herstellung von Kulturimpfstoffen. *Zentralbl. f. Bakt.*, (abt. 1) **148**:257-264, 1942.

15. *Gallardo, E.; Sanz, J. & Perez Gallardo, F.* — Datos experimentales sobre el cultivo de la *Rickettsia prowazeki* en la membrana vitelina de embrion de pollo, *Rev. Sanidad e Hig. Publica*, **18**:269-273, 1944.

16. *Cox, H. R.* — Rocky Mountain spotted fever. Protective value for guinea-pigs of vaccine prepared from Rickettsiae cultivated in embryonic chick tissues, *Public Health Reports*, **54**:1070-1077, 1939.

17. *Cox, H. R.* — Epidemic and endemic typhus: protective value for guinea-pigs of vaccines prepared from infected tissues of the developing chick embryo, *Public Health Reports*, **66**:110-115, 1940.

18. *Tchang, J. & Mathews, G. B.* — Anti-typhus vaccine prepared from *Rickettsia prowazeki* cultivated in yolk sac of developing chick embryo, *Chinese Med. J.*, **58**:440-445, 1940.

19. *Travassos, J. & Vallejo-Freire, A.* — Vacina de Cox contra a febre maculosa, *Rev. Bras. Biologia*, **4**:161-166, 1944.

20. *Weigl, R.* — Die Methoden der aktiven Fleckfieber-Immunisierung, *Bull. Acad. Polon. Sc. Med.*, **25**, 1933.

21. *Zinsser, H. & Castañeda, M. R.* — A method of obtaining large amounts of *Rickettsia prowazeki* by X-ray radiation of rats, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **29**:840-844, 1931/32.

22. *Zinsser, H. & Macchiavello, A.* — Enlarged tissue cultures of European typhus Rickettsiae for vaccine production, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **35**:84-87, 1936/37.

23. *Zinsser, H.; Wei, H. & Fitzpatrick, F.* — Agar slant tissue cultures of typhus Rickettsiae, both types, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **37**:604-606, 1937/38.

24. *Zinsser, H.; Wei, H. & Fitzpatrick, F.* — Nouvelles methodes de culture de Rickettsiae du typhus a propos de la production de vaccins, *C. R. Soc. Biol.*, **127**:229-232, 1938.

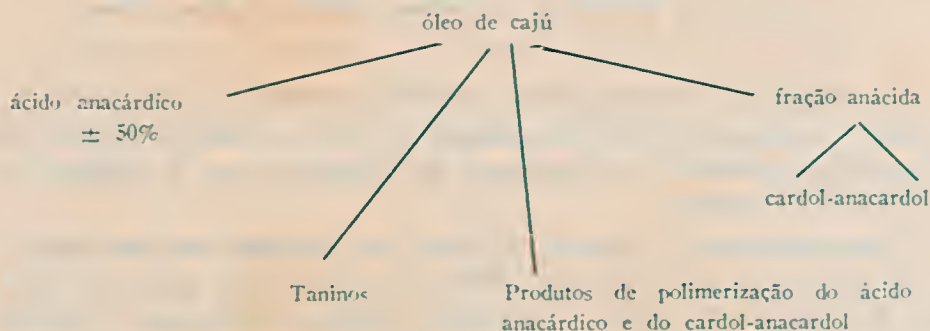
25. *Castañeda, M. R.* — Experimental pneumonia produced by typhus Rickettsiae, *Amer. J. Path.*, **15**:467-475, 1939.

26. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* — Rocky Mountain Spotted Fever: vaccination of monkeys and man, *Public Health Reports*, **40**:2159-2167, 1925.

27. *Penna, H. A.* — New technique for aseptic removal of chick embryo from egg, *Amer. J. Trop. Med.*, **19**:589-592, 1939.

28. *Macchiavello, A.* — Estudios sobre bacteriologia e inmunologia del tifo exantematico. Santiago, Chile, *Soc. Imprensa y Litografia Universal*, 1938.

comercialmente, por um processo de aquecimento que faz arrebentar as castanhas deixando em liberdade o óleo. Além do óleo puro, foram ainda usados: ácido anacárdico, anacardato de sódio, anacardol, a fração cardol-anacardol, que denominaremos doravante de "fração anácida", representando a parte sobrenadante depois da precipitação do ácido anacárdico pelo hidróxido de chumbo.

A composição do óleo de cajú pode ser esquematizada da maneira seguinte:

O ácido anacárdico foi usado tanto como ácido puro, como sob a fórma do sal sódico (anacardato de sódio).

Tôdas as substâncias purificadas foram preparadas na Seção de Quimica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelo Prof. H. Hauptmann e Srta. Hanna Rothschild. Pormenores dos caractéres fisico-quimicos dos mencionados produtos e os métodos de sua preparação foram descritos por Eichbaum, Hauptmann e Rothschild (7).

Após observações *in vitro* com várias concentrações de anarcadato de sódio que mostraram ação nitidamente vermicida sôbre *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis* e *Toxocara canis*, resolvemos iniciar experiências *in vivo*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para êste fim usamos cães num total de 26 que nos foram fornecidos pela Prefeitura da Capital. Não levamos em consideração quer a raça, sexo ou côr dos animais e todos faziam parte dos chamados "vira lata" que são capturados diariamente nas ruas da Capital.

Para a verificação do grau de infestação usamos exclusivamente o método original de Stoll (8), porém ao em vez de uma lâmina contavamos duas, diminuindo assim, ainda mais, as possiveis causas de erro. Faziamos sempre três contagens antes (às vêzes quatro e raramente duas) e três depois (às vêzes quatro ou cinco e raramente duas), em dias seguidos, da medicação. Levamos

sempre em consideração a consistência das fezes, tomando como base fezes "formadas", portanto multiplicavamos o número de ovos encontrados por 2 quando em face de fezes moles e por 4 quando diarrêicas. Não fizemos verificação quanto ao número de vermes expulsos. Os nossos números se referem, por tanto, ao número de ovos encontrados antes e depois da medicação, bem como ao número de vermes encontrados depois da necropsia.

Para comparação quanto ao número de ovos por grama de fezes, fizemos contagens em 6 cães não tratados os quais foram posteriormente sacrificados e os seus vermes contados. Estes resultados são referidos no quadro No. 1, os quais servirão de base para os nossos cálculos. Como mostra esta tabela, no

QUADRO I

*(relação ovo-verme por grama de fezes)*

*(Ancylostoma)*

| Cão No. | No. médio de ovos por grama | Vermes encontrados | N.o de ovos por verme |
|---|---|---|---|
| 10 | 6.383 | 193 | 33 |
| 18 | 10.966 | 137 | 80 |
| 37 | 3.666 | 23 | 159 |
| 40 | 4.189 | 19 | 220 |
| 41 | 2.837 | 22 | 129 |
| 42 | 7.462 | 45 | 165 |
| Total — 6 | 35.501 | 439 | 786 |
| Media por cão | 5.912 | 73 | 131 |

caso de *Ancylostoma*, a relação verme-ovo por grama de fezes é de 1:130; no caso de *Trichuris* esta relação é aproximadamente de 1:25, precisando-se ainda de mais dados estatísticos para apurar êstes resultados obtidos em número relativamente pequeno de animais. Quanto à relação ovo-verme de *Toxocara* não temos elementos suficientes para uma comparação exata ou mesmo aproximada, baseando-se os nossos resultados somente nos exames pré e post-medicação dos cães Nos. 13, 25 e 39.

Nenhum dos cães tratados mostrou, durante o tempo de observação, que variou de 5 dias a 4 semanas, sinal de intoxicação.

Para controlar o efeito vermicida nos cães tratados êstes eram sacrificados 3-4 dia após a medicação, o intestino e o estômago foram dessecados para a verificação da presença ou ausência de vermes. Depois da inspecção macroscópica dos órgãos parenquimatosos, pedaços de fígado, rim, baço, coração, pulmão, intestino e estômago eram retirados e fixados em formol-fisiológico a 10% e submetidos a exame microscópico (córtes histológicos corados pelo sudan-hematoxilina e eosina-hematoxilina).

Em alguns casos (4 cães tratados e 2 de contrôle) foram feitos testes funcionais de fígado, a saber a reação de Takata, o teste da floculação da cefalina (Hanger) e a determinação da bilirubina, direta e indireta no sôro (Tabela I e II).

Para fins de estudos toxicológicos aplicamos nos cães Nos. 14, 15, 17, 28 e 36 quantidades de drogas (óleo puro, ácido anacárdico) variando de 6 a 40 $cm^3$, aplicadas 1-2 vêzes no período de 14 dias. Os animais assim tratados foram sacrificados e autopsiados 3-4 semanas após o início do tratamento.

Todos os cães destinados ao tratamento receberam a última ração às 14 horas, permanecendo sem receber novo suprimento até às 9 horas do dia seguinte quando então eram medicados.

As substâncias enumeradas mais detalhadamente nos protocolos, eram aplicadas por via gástrica, seja por meio de cápsulas gelatinosas contendo cada uma 1 $cm^3$ da droga, seja por meio de sonda. Fóra das quantidades excessivas, aplicada com o fim de verificar a toxidez, as doses variaram de 2½ a 8 $cm^3$, levando para tanto, em geral, em consideração o pêso do animal, não se considerando, entretanto, com rigor êste ponto.

Como referimos linhas atrás as nossas experiências preliminares *in vitro* foram realizadas usando-se o sal sódico do ácido anacárdico (anacardato de sódio) razão pela qual também as primeiras experiências *in vivo* foram feitas com êste sal.

Não sendo animadores os resultados obtidos, passamos a ensaiar, em seguida, o óleo puro tendo como veículo u'a emulsão de goma arábica (julepo gomoso) e que será sempre referido como "emulsão". Aqui os resultados foram bastantes encorajadores, o que nos levou a insistir nas experimentações.

Passamos em seguida a experimentar o óleo puro (sem nenhuma mistura), sôbre o qual mais insistimos pelo fato de obtermos resultados plenamente satisfatórios. Pesquisamos ainda a ação do ácido anacárdico, ácido anacárdico

TABELA I

*Os resultados dos exames histológicos são resumidos na tabela seguinte*

| Cão No. | Pêso | Medicação oral | Autopsia ...dias após últ. medicação | Histologia | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Fígado | Rim |
| 14 | 18 kg | 2x100 cm³ de emulsão c/ intervalo de dois dias | 7 | Coloração marron laranja difusa das células hepáticas. Vacuolização + óleo nos grandes ductus biliares ++ | Glomerulos: normais; acumulação (eliminação) do óleo em quasi todos túbulos contortos e na alça de Henle +++ |
| 15 | 12 kg | Idem | 1 | Vacuolização das células hepáticas +. Óleo nos grandes ductus biliares ++ | Glomerulos: normais; óleo nos túbulos contortos e na alça de Henle + |
| 17 | 22 kg | 2x125 cm³ de emulsão c/ intervalo de dois dias | 3 | Vacuolização das células hepáticas +++. Acumulação de óleo nas cél. reticul. ++ | Óleo nos glomerulos ++. Óleo nos túbulos contortos e na alça de Henle ++. |
| 23 | 7 kg | 15 cm³ de óleo puro | 16 | Vacuolização das células hepáticas +++. Óleo nas cél. reticul. ++ e nos grandes ductus biliares +++. | Fraca coloração difusa marron-laranja dos tub. ret. (alça de Henle) e contortos. |
| 11 kg | 35 | 7 cm³ de ácido anacárdico | 4 | Vacuolização das células hepáticas 0. Células hep. c/ lig. col. laranja difusa. Óleo nos grandes ductus biliares ++. | Óleo em isolados glomerulos +; lig. col. laranja difusa dos túbulos contortos. |
| 36 | 6 kg | 6 cm³ de óleo puro | 1 h 30' | Vacuolização das células hepáticas ++. Óleo nos grandes ductus biliares + . ++. | Glomerulos: normais; óleo nos túbulus contortos +, na alça de Henle ++ . +++. |
| Normal I | 18 kg | Não recebeu tratamento | ...... | Inchação turva das cel. hept.; infiltr. gordurosa + na periferia dos lóbulos. | Nefrite intersticial +. Glomerulos: normais. |
| Normal II | 15 kg | Idem | ...... | Ligeira vacuolização das cel hept +. Infiltr. gordurosa na perif. dos lóbulos + . ++. | Glomerulos, túbulos contortos e retos de aspecto normal. |

TABELA II

*Provas funcionais de fígado*

| Cão No. | Pêso | Medicação | Bilirubina mg. | Bilirubina direta | Cefalina 24 hs. | Cefalina 48 hs. | Takata |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Normal I | ? | Sem medicação | 0,305 | neg. | ++++ | ++++ | ++ |
| Normal II | ? | Idem | 0,278 | neg. | ++++ | ++++ | + |
| 28 | 7 kg | 15/6/46: 15 cm³ de óleo puro | a 18/6/46: 18/6/46: | neg. | ++++ | ++++ | neg. |
| 29 | 7½ kg | 6/6/46: 2,5 cm³ de anacardol. 13/6: anacardol. 18/6: 3 cm³ fração anacida + 3 cm³ ácido anacárdico | 0,204 | neg. | + | ++++ | ++ |
| 31 | 10 kg | 13/6/46: 6 cm³ fração anácida. 18/6: 3 cm³ fração anácida + 3 cm³ ácido anacárdico | 18/6/46 0,250 27/6/46: 0,370 | neg. neg. | ++++ + | ++++ ++++ | neg. + |
| 6½ kg | 32 | 13/6/46: 6 cm³ fração anácida. 18/6: 3 cm³ fração anácida + 3 cm³ ácido anacárdico | 18/6/46 0,398 27/6/46: 0,241 | neg. neg. | ++++ + | ++++ ++++ | neg. + |

+ fração anácida, fração anácida e, finalmente, em um único caso, o anacardol. Todas as experiências foram feitas de acôrdo com o esquema seguinte:

TABELA III
*(exemplificação das diversas experiências)*

*Cão No. 22* | *Peso: 11½ kg* | Data: 21/5/46

Diagnóstico { Ancylostoma / Trichuris

| | | |
|---|---|---|
| No. médio de ovos por grama de fezes | Ancylostoma ............... | 177320 |
| | Trichuris .................. | 1040 |
| No. de vermes que devia existir | Ancylostoma ............... | 1353 |
| | Trichuris .................. | 42 |

TRATAMENTO

A 23/5/46 recebeu 5 cápsulas de óleo puro (= 5 cm³)

| | | Redução |
|---|---|---|
| 1.ª contagem (24/5/46) | Ancylostoma: 800 ovos .......... | 99,55% |
| | Trichuris: negativo ........ ... | 100 % |
| 2.ª contagem (27/5/46) | Ancylostoma: 100 ovos .......... | 99,9 % |
| | Trichuris: 800 ovos ............ | 23,1 % |

| Sacrificado a 27/5/46: | Redução |
|---|---|
| *Ancylostoma*: Havia 2 ♂♂ e 2 ♀♀ da espécie *Ancylostoma braziliense* | 99,8% |
| *Trichuris*: Havia 3 ♀♀ e 1 ♂ .................................... | 90,5% |

RESULTADOS

1) *Ação vermicida do anacardato de sódio.* Nas experiências com o anacardato de sódio usamos sòmente 2 cães, os quais receberam 1.1 e 1.2 g respectivamente. Não foram feitas contagens de ovos antes da medicação, baseando-se, por isso, os resultados apresentados, sòmente na positividade ou negatividade dos exames de fezes posteriores ao tratamento e após o sacrifício do animal. Resulta daí não termos elementos seguros para julgar o valor real da droga empregada, excepto que nas dóses usadas não teve efeito decisivo em nenhuma espécie dos seguintes vermes: *Ancylostoma, Trichuris* e *Dipylidium.*

2) *Ação vermicida da "emulsão".* Denominamos "emulsão" á mistura de julepo gomoso contendo 20% de óleo puro. Pensando numa possível ação irritante sôbre as mucosas gástricas e entéricas foi que lançamos mão da mistura acima referida, imaginando que assim poderiamos contornar, em certo grau, aquêle efeito desagradavel, bem como servir de corretivo.

### Quadro II

*Resumo dos resultados obtidos com "emulsão"*

| Cão | | NOPG | | | NTV | | | Tratamento | | NDUM | NOPG | | | ROP | | | Autopsia | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | VE | | | RV | | | |
| No. | Pêso (kg) | A | Tr | To | A | Tr | To | Dr | Dg | | A | Tr | To | A | Tr | To | A | Tr | To | A | Tr | To | |
| 5 | ? | 10.500 | 200 | | 80 | 8 | | E | 50 cm³ | 6 | 100 | 0 | | 99,1% | 100% | | 18 | 0 | | 77,5% | 100% | | Havia 1 exemplar de *Dipylidium* |
| 6 | ? | 3.000 | | | 23 | | | " | " | 7 | 0 | | | 100% | | | 5 | | | 78,3% | | | |
| 7 | 11 | 1.100 | 100 | | 8 | 4 | | " | " | 2 | 0 | 300 | | 100% | 0% | | 6 | 0 | | 25% | 100% | | |
| 8 | 7 | 10.920 | | | 83 | 1 | | " | 30 cm³ | 2 | 0 | 0 | | 100% | 100% | | 0 | 1 | | 100% | ? | | |
| 9 | 6 | 14.400 | 1.900 | | 109 | 76 | | " | 30 cm³ + 60 cm³ | 3 | 200 | 0 | | 98,7% | 100% | | 8 | 0 | | 92,7% | 100% | | |
| 11 | 8½ | 7.433 | 166 | | 56 | 6 | | " | 50 cm³ | 4 | 0 | 0 | | 100% | 100% | | 0 | 6 | | 100% | ? | | |
| 12 | 11 | 3.700 | 66 | | 28 | 3 | | " | " | 3 | 400 | 0 | | 89,2% | 100% | | 13 | 1 | | 54% | 66,7% | | |
| 13 | 13 | 16.000 | | Não contados | 127 | | ? | " | " | 3 | 0 | | 0 | 100% | | 100% | 0 | | 0 | 100% | | 100% | |

LEGENDAS:

NOPG = No. de ovos por grama de fezes
NDUM = No. de dias depois da última medicação
NTV = No. teórico de vermes
ROP = Redução dos ovos nas fezes
RV = Redução dos vermes
VE = Vermes encontrados
E = Emulsão

Dr = Droga
Dg = Dosagem
A = Ancylostoma
Tr = Trichuris
To = Toxocara
OP = Óleo puro

## Quadro III

*Resumo dos resultados obtidos como óleo puro de cajú*

| Cão | | NOPG | | | NTV | | | Tratamento | | NDUM | NOPG | | | ROP | | | Autopsia | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | VE | | | RV | | | |
| No. | Pêso (kg) | A | Tr | To | A | Tr | To | Dr | Dg | | A | Tr | To | A | Tr | To | A | Tr | To | A | Tr | To | |
| 16 | 15 | 4.280 | 33 | | 33 | 2 | | OP | 8 cm³ | 4 | 100 | 0 | | 97,7% | 100% | | 3 | 1 | | 91% | 50% | | |
| 20 | 8 | 6.400 | 2.200 | | 45 | 88 | | - | 4 cm³ + 4 cm³ | 3 | 150 | 0 | | 97,7% | 100% | | 6 | 0 | | 87,5% | 100% | | |
| 21 | 10 | 6.500 | 381 | | 46 | 15 | | - | 6 cm³ | 3 | 250 | 50 | | 95,9% | 97% | | 1 | 1 | | 97,9% | 93,4% | | |
| 22 | 11½ | 117.320 | 1.040 | | 1.353 | 42 | | - | 5 cm³ | 4 | 100 | 800 | | 99,5% | 23,1% | | 4 | 4 | | 99,8% | 90,5% | | *A. braziliense* |
| 23 | 2½ | 88.800 | 266 | | 677 | 10 | | - | 2,5 cm³ | 4 | 0 | 0 | | 100% | 100% | | 0 | 4 | | 100% | 60% | | Amanheceu morto 9 dias após a medicação |
| 24 | 10 | 11.518 | | | 87 | | | - | 6 cm³ | 3 | 0 | | | 100% | | | 2 | | | 97,7% | | | Havia 2 ♂♂ de *Trichuris* |
| 25 | 6 | 2.600 | | 633 | 19 | | ? | - | 5 cm³ | 3 | 0 | | 0 | 100% | | 100% | 0 | | 0 | 100% | | 100% | |
| 27 | 5½ | 4.033 | 2.350 | | 31 | 94 | | - | 6 cm³ | 28 | 0 | 0 | | 100% | 100% | | | | | | | | Não foi sacrificado |
| 28 | 7 | 6.175 | 150 | | 47 | 6 | | - | 15 cm³ | 16 | — | — | | — | — | | 0 | 0 | | 100% | 100% | | Havia cêrca de 1 dezena de *Dipylidium*. |
| 39 | 8 | 4.651 | 200 | 50 | 36 | 3 | ? | - | 6 cm³ | 4 | 50 | 0 | 0 | 99% | 100% | 100% | 2 | 6 | 0 | 94,5% | 25% | 100% | |
| Médias gerais | 8,35 | 312,36 | 622,2 | 68,3 | 237,7 | 26,5 | ? | | 6,75 | 7,2 | 65 | 85 | 0 | 98,8% | 77,5% | 100% | 18 | 16 | 100% | 96,5% | 74,1% | 100% | |

LEGENDAS:

NOPG = No. de ovos por grama de fezes
NDUM = No. de dias depois da última medicação
NTV = No. teórico de vermes
ROF = Redução dos ovos nas fezes
RV = Redução dos vermes
VE = Vermes encontrados
E = Emulsão

Dr = Droga
Dg = Dosagem
A = Ancylostoma
Tr = Trichuris
To = Toxocara
OP = Óleo puro

Usamos um total de 8 cães cujos resultados foram sintetizados no Quadro II. Sôbre o *Ancylostoma* os resultados foram sempre bons, dando uma percentagem de redução elevada, em geral acima de 77,5%, excepto num cão (No. 7) que foi apenas de 25%. Em *Trichuris* foram os resultados obtidos igualmente animadores, elevando-se em geral a 100% a percentagem de redução, salvo no cão No. 11, sôbre o qual parece não ter agido (ver Quadro II).

3) *Ação vermicida do "óleo puro"*. O óleo puro da castanha de cajú,sem nenhuma mistura, era administrado por meio de cápsulas gelatinosas ou sonda gástrica. As cápsulas continham sempre 1 cm³ da substância. Nas experiências com o óleo puro utilizamos 10 cães nos quais, aparentemente, houve tolerância perfeita. Sôbre o *Ancylostoma* agiu bem, dando uma percentagem de redução acima de 95%, excepto no cão No. 20 que foi apenas de 87, 5%. Em relação aos *Trichuris* também foi elevada a percentagem de redução, salvo em 2 casos em que foram baixas, sendo 1 de apenas 25% (cão No. 39) e outro de 50% (cão No. 16). Também em 2 casos infestados com *Toxocara* obtivemos uma eliminação total. Damos, em resumo, no Quadro III. os resultados alcançados. [a])

4) *Ação vermicida do "ácido anacárdico"*. Foram usados sómente 2 cães, Nos. 34 [b]) e 35 [c]). No animal No. 34 houve uma redução no número de ovos de cêrca de 78, 9% em relação ao *Ancylostoma*, e de 100% em relação ao *Trichuris*. Este cão foi posteriormente medicado com o óleo puro o que resultou uma redução de 94.8% em relação ao *Ancylostoma*. O animal No. 35 estava infestado só com *Ancylostoma*, dando uma redução final de 100%. O protocolo seguinte serve para exemplificar o andamento das diversas experiências (Tabela II)

5) *Ação vermicida da "fração anácida"*. As experiências com a fração anácida (cardol-anacardol) absorveram sómente 3 cães, Nos. 31, [d]) 32 [e]) e 33). [f] pois os resultados obtidos não foram encorajadores. Nos cães, Nos. 31 e 33 a droga foi destituida de qualquer ação. Embora no cão No. 32 parecesse, em principio, haver certa redução no número de ovos, este chegou a se elevar a 29.500 por grama de fezes, o que veio confirmar o valor negativo das experiências, pelo menos é o que podemos afirmar, levando em consideração as dóses administradas.

---

*a*) a quantidade de óleo puro aplicada variou entre 2.5 — 8 cm³, de acordo com o peso dos animais (2.5 — 15 kg).

*b*) quantidade aplicada de ácido anacardico no cão No. 34 (8 kg) = 5 cm³.

*c*) quantidade de ácido anacardico aplicada no cão No. 35 (11 kg) = 7 cm³.

*d*) quantidade de poção anácida aplicada no cão No. 31 (10 kg) = 6 cm³.

*e*) quantidade de poção anácida aplicada no cão No. 32 (6.5 kg) = 9 cm³.

*f*) quantidade de poção anácida aplicada no cão No. 33 (7.5 kg) = 6 cm³.

Os cães Nos. 31 e 33 receberam então 5 e 7 dias respectivamente, depois, 6 cm.$^3$ de óleo puro, apresentando em seguida uma redução de 100%. O cão No. 32, 5 dias após a medicação pela fração anácida, recebeu u'a mistura de 3 cm$^3$ de ácido anacárdico + 3 cm$^3$ da fração anácida, o que conduziu em 2 dias a um desaparecimento quase total de todos os vermes (*Ancylostoma* e *Trichuris*).

Os resultados assim obtidos foram praticamente iguais àqueles obtidos com o oleo puro.

TABELA IV

*Exemplo de uma experiência mista (aplicação de 2 drogas)*

*Cão No. 34* — *Pêso: 8 kg* — Data: 11/7/46

Diagnóstico: Ancylostoma, Trichuris

| | | |
|---|---|---|
| No. médio de ovos por grama de fezes | Ancylostoma | 7560 |
| | Trichuris | 140 |
| No. de v. q. teoric. devia existir | Ancylostoma | 57 |
| | Trichuris | 6 |

TRATAMENTO

A 15/7/46 recebeu 6 cápsulas de ácido anacárdico

| | | *Redução* |
|---|---|---|
| 1.ª contagem (16/7/46) | Ancylostoma: 9.050 ovos | 0 % |
| | Trichuris: 50 ovos | 64,3% |
| 2.ª contagem (19/7/46) | Ancylostoma: 3.600 ovos | 52,4% |
| | Trichuris: negativo | 100 % |
| 3.ª contagem (23/7/46) | Ancylostoma: 2.500 ovos | 77 % |
| | Trichuris: negativo | 100 % |
| 4.ª contagem (24/7/46) | Ancylostoma: 3.350 ovos | 55,7% |
| | Trichuris: negativo | 100 % |
| 5.ª contagem (25/7/46) | Ancylostoma: 1.600 ovos | 78,9% |
| | Trichuris: negativo | 100 % |

A 25/7/46 recebeu 6 cápsulas de óleo crú

| | | |
|---|---|---|
| 1.ª contagem (26/7/46) | Ancylostoma: 1.650 ovos | 78,2% |
| | Trichuris: negativo | 100 % |
| 2.ª contagem (31/7/46) | Ancylostoma: 100 ovos | 98,7% |
| | Trichuris: negativo | 100 % |
| 3.ª contagem (1/8/46) | Ancylostoma: 50 ovos | 99,4% |
| | Trichuris: negativo | 100 % |
| Sacrificado a 1/8/46: | *Ancylostoma*: Havia 2 ♂♂ e 1 ♀ | 94,[illegible] |
| | *Trichuris*: negativo | 100 % |

## RESULTADOS DAS AUTOPSIAS

### *Macroscópico*

O aspecto do estômago e do intestino delgado e grosso não mostrou nada de anormal em caso algum: ausência de qualquer irritação local. Também os órgãos parenquimatosos: fígado e rim, baço, pulmão, coração, etc. ofereceram aspecto perfeitamente normal.

### *Microscópico*

Exame microscópico do rim, fígado, baço, pulmão, coração, estômago, intestino de 6 cães tratados (Nos. 14, 15, 17, 28, 35 e 36) e de 2 cães não tratados (I e II).

Fixação em forma a 10% durante 48 horas e coloração pelo sudan III-hematoxilina (cortes de congelação) e hematoxilina-eosina (cortes de parafina).

Visto que o óleo de cajú e o ácido anacárdico formam com o sudan um complexo de côr marron-laranja, a sua presença pode ser facilmente identificada nos cortes histológicos. Uma certa dificuldade de identificação encontramos somente no baço, onde tinha também nos cães não tratados numerosos pigmentos hematogênicos, que em geral apresentam, aliás, uma coloração mais escura, sem o nape de laranja.

Assinalando nos protocolos a presença do óleo em certas células, deixamos aberto, si se trata de fato do óleo sob a forma aplicada, ou de produtos secundários formados no organismo (*).

*Estômago e intestino*: mostraram em todos os casos uma mucosa intacta, sem qualquer sinal de irritação local.

*Coração e pulmão*: de aspecto normal.

*Baço*: Em alguns casos dos animais tratados verificou-se intensa deposição de um pigmento marron-escuro no reticulo, que aliás foi encontrado também no baço de um dos cães não tratados (contrôle).

*Fígado*: O fígado dos animais não tratados mostrou uma ligeira infiltração gordurosa, principalmente na periferia dos lóbulos, notando-se ainda uma inchação turva na maioria das células parenquimatosas. Quatro dos seis animais tratados com altas doses de óleo apresentaram uma difusa vacuolização das

(*) Deve-se lembrar que o óleo de cajú forma complexos com a formalina, fato êste muito usado na fabricação de substâncias plásticas na base do óleo

células parenquimatosas e uma deposição do óleo nas células de Kupfer e nos histiocitos do campo peri-portal. A maior acumulação do óleo notou-se nos epitelios dos grandes dutos biliares, que estavam infartados com goticulas oleosas. O grau de vacuolização não mostrou relação nitida com a quantidade de óleo aplicada por kg de pêso corporal Tabela I). Assim, um cão tratado com 2 x 100 cm³ de uma emulsão de óleo a 20% (cão No. 15) apresentou um figado praticamente normal, na autopsia 1 semana após a última ingestão do óleo; outro animal (No. 28) tratado com 15 cm³ de óleo puro e sacrificado 16 dias após, revelou um alto grau de vacuolização das células hepáticas.

*Rim*: Cães não tratados:

Cão I — nefrite intersticial

Cão II — sem particularidades

*Cães tratados*: Em todos os casos verificou-se uma acumulação intensa de óleos nos túbulos contortos e mais fracamente na alça de Henle. No interior dos capilares do glomerulo só raramente foram encontrados maiores quantidades de goticulas de óleo. Fóra disso, as células parenquimatosas não apresentaram nenhum sinal de lesão.

O número dos exames histológicos não é suficiente para se chegar a uma conclusão definitiva, tanto mais que os cães não tratados mostraram certas alterações das células hepáticas que não podem ser consideradas normais.

Nos cães tratados impressiona que a maioria mostre uma vacuolização mais ou menos generalizada das células hepáticas, indicando um certo comprometimento do parenquima; seriam necessárias observações em maior número de animais e com um tempo mais dilatado de observação para se poder apurar êstes achados.

Quanto à acumulação (eliminação?) do óleo nos grandes dutos biliares e no rim, impressiona o fato que mesmo nos cães sacrificados 7-16 dias depois da última medicação o óleo aparentemente ainda não havia sido inteiramente eliminado.

Como mostra a Tabela II, praticamente não existe diferença nos resultados dos testes funcionais de figado obtidos dos cães normais e dos cães tratados. A bilirubina direta foi negativa em todos os casos; a dosagem da bilirubina em mg deu em todos os casos valores dentro do limite normal, variando de 0.204 a 0.398 (nos cães tratados) e de 0.278 a 0.305 (nos cães normais). A floculação da cefalina foi positiva em todos os animais, a reação de Takata + — ++ nos cães normais e nos tratados variando de 0 — ++.

## DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Pelas experiências descritas ficou provado que o óleo de cajú aplicado por via oral em cães, infestados expontaneamente com certas espécies de vermes, possui uma nítida ação vermicida sôbre *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis* e, em grau mais ou menos elevado sôbre *Trichuris vulpis*. As doses que provocam tal efeito estão a grosso modo compreendidas entre 2,5 a 8 $cm^3$ em cães de pêso entre 2½ a 16 kg. A atividade vermicida se manifesta em primeiro lugar, de acôrdo com as nossas observações, sôbre o *Ancylostoma caninum*, cujo número é reduzido com uma única aplicação da droga a cêrca de 95%, em média. Conquanto as observações em cães infestados com *Toxocara canis* sejam relativamente pequenas para permitir uma apreciação detalhada, — a atividade do óleo de cajú sôbre esta espécie de helminto parece ser excelente. Temos a impressão de que seja mesmo mais sensível que o próprio *Ancylostoma caninum*, pois que com uma única dose e nos três casos neste trabalho relatados a eliminação foi total. (Quadro No. III) Em relação ao *Trichuris vulpis* os resultados obtidos não são tão conclusivos. Posto que só na metade dos animais tratados a redução tenha sido de 90-100%, nos outros, esta variou entre 25-60%. Também os cães infestados com *Dipylidium*, que depois de medicados ainda revelaram a presença de exemplares vivos no intestino, não permitem nenhuma conclusão certa sôbre o poder vermicida do óleo de cajú sôbre esta espécie de verme.

Quanto à atividade *in vivo* do ácido anacárdico, substância altamente ativa *in vitro*, obtivemos em 1 caso (11 kg de pêso) tratado com 7 $cm^3$ da substância a eliminação total dos *Ancylostoma* e num outro (8 kg de pêso) que recebeu 6 $cm^3$ a redução foi de 78,9%, valor êste abaixo da média dos cães tratados com o óleo puro. Por outro lado a combinação do ácido anacárdico com a fração anácida — por si só sem efeito vermicida — eleva a atividade do ácido anacárdico, dando uma redução de 90-100%. Parece assim que a atividade do ácido anacárdico é reforçada em presença da fração anácida, composta na maior parte de cardol e anacardol; experiências em maior escala teriam que decidir, provavelmente, em favor desta hipótese, que está em certo paralelo com as observações de Roger (9) que verificou uma ativação do poder vermicida do hexilresorcinol em presença de detergentes.

O anacardol, igual à fração anácida, parece destituido de ação vermicida na dose empregada.

O óleo de cajú não exerceu ação tóxica local ou geral que se manifestasse clinicamente nos animais tratados. Entre 26 animais tratados houve apenas 1 caso de morte num cão de 2½ kg de pêso medicado com 2,5 cm³ de óleo, sem que pudessemos relacionar, com certeza, êste acidente ao tratamento, posto que outros cães tratados com doses maiores (cálculo por kg de pêso) não revelaram quaisquer sintomas clínicos de intoxicação. Quanto a certas alterações histológicas no fígado dos cães medicados (vacuolização) não chegamos a uma apreciação definitiva porquanto também os fígados dos animais não tratados mostraram ligeiras modificações das células hepáticas. Um outro fato ao qual no início de nossas experiências não prestamos a devida atenção foi o tóxico usado para o sacrifício dos animais, o clorofórmio, o qual poderia também influenciar no aspecto histológico do fígado.

Depois de termos verificado a ausência de sintomas tóxicos para os cães, experimentamos em nós mesmos o efeito de 2 cm³ do óleo de cajú puro, que ingerimos na parte da manhã, em jejum. Enquanto um de nós tenha tido cêrca de 2 h depois da ingestão evacuações nitidamente diarréicas, o outro apresentou tão somente ligeira sensação de pêso no estômago que persistiu por algumas horas; na urina eliminada 4 horas depois verificou-se a presença do óleo, que no frasco abandonado no ambiente, se separou em duas camadas, sendo que a superior formou na superfície uma película iridescente.

Depois destas experiências preliminares em nós mesmos, começamos as observações clínicas em pacientes portadores de ancilostomose (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*). Fóra dos exames parasitológicos realizados 3-5 dias antes (contagens de ovos) do tratamento, todos os casos foram submetidos a rigorosos testes complementares, tais como testes funcionais de fígado (Takata, Henger, bilirubina), função renal (exame químico geral, uréa clearence, sedimento), bem como exame clínico e hematológico.

A quantidade de óleo aplicada em cápsulas gelatinosas variou de 2 a 8 cm³. Na maioria dos casos a ingestão da droga era seguida 2 h depois por evacuações diarréicas. Como sintomas subjetivos os pacientes assinalaram unicamente ligeira dór no epigastro direito, que desaparecia logo depois das primeiras evacuações.

Podemos adiantar que contamos até agora só com 2 casos humanos bem estudados e com os seguintes resultados: 1.°) apresentando 150 ovos de *Necator* por grama de fezes, não revelando, após 3 dias do tratamento a presença de

ovos. O segundo caso, apresentando cêrca de 10.000 ovos por grama de fezes, igualmente foi negativo mesmo após 3 dias de observação. Este apresentou após 10 dias uma contagem de 400 ovos ou seja uma redução de 96%.


RESUMO

No presente trabalho os A. A. demonstram que o óleo de cajú — fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*) — e derivados possuem nítida ação vermicida tanto *in vitro*, como *in vivo* (cães) sôbre o *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis* e, em grau relativamente elevado, sôbre o *Trichuris vulpis*. Nos 2 casos de cães infestados com *Dipylidium caninum* não obtiveram resultados positivos.

As doses empregadas variaram de 2,5 a 8 $cm^3$. Posto que quantidades muito maiores tenham sido empregadas com o fim de estudos toxicológicos, nenhum sintoma de intoxicação foi observado.

A administração foi sempre pela via oral, por meio de cápsulas gelatinosas contendo 1 $cm^3$ da substância ou com sonda gástrica.

Os melhores resultados foram obtidos com o óleo puro (sem nenhuma mistura), cuja percentegem de redução se elevou a 96,8% no caso de *Ancylostoma*, a 100% em relação ao *Toxocara* e de 77,3% sôbre o *Trichuris*.

Foi notado um efeito purgativo em vários cães medicados quer pelo óleo puro, quer pelo ácido anacárdico.

Doses maciças usadas nos testes toxicológicos não provocaram sintomas clínicos ou lesões macroscópicas do canal intestinal e dos órgãos parenquimatosos. Nos cortes histológicos de fígado foi verificada uma forte acumulação de óleo nas células de Kupfer e nos epitelios dos grandes dutos biliares, evidenciando-se ao mesmo tempo, na maioria dos casos, uma difusa vacuolização das células hepáticas, — alterações pouco conclusivas —, tanto que também os animais não tratados revelaram sinais de ligeiro comprometimento celular hepático. Os rins evidenciaram forte acumulação de gotículas de óleo, particularmente nos túbulos contortos, na alça de Henle e, isoladamente, também nos glomerulos. Fóra disso as células renais apresentavam aspecto normal. Não foi encontrado nenhum sinal macro - ou microscópico indicando irritação local das mucosas gastro-intestinais.

Os testes funcionais de fígado deram resultados concordantes nos animais tratados e não tratados.

A clínica humana já foi iniciada e com resultados promissores.

ABSTRACT

Cashew oil, the nutshell liquid of the Brazilian tree *Anacardium occidentale* L., and its main constituent, anacardic acid, have a strong vermicidal activivy *in vitro*, as has been shown recently by Eichbaum. The present experiments, which were performed on a total of 26 dogs, spontaneously infested with a variety of worms, revealed a strong anthelmintic activity of these substances also in living animals, without clinically appearant signs of local or general toxicity.

There could be noted too a marked purgative effect of cashew oil and anacardic acid.

The drugs were applied by gastric tube or in gelatine capsules, containing 1 g. of substance, each. The given dosis varied between 2.5-8g. according to the body weight of the treated animals.

Among the drugs tested (crude oil, sodium anacardate, anacardol, a mixture of cardol-anacardol) the crude oil showed the highest activity.

The best results were obtained in dogs infested with *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis;* the elimination of worms — controled by autopsies — varied in these cases between 90-100% after the application of a single dose (4g. on the average).

The activity against *Trichuris vulpis* was less pronounced, but even here the reduction of worm eggs reached, in half of the treated animals, values between 90-100%; in the other half, the reduction value observed varied between 25-60%, with an average reduction value of approximately 75% for all animals treated.

Functional liver tests in animals treated with very high dosis (up to 15g) gave the same results as those obtained in the control animals: in both group — treated and non-treated dogs — the cephalin flocculation test was positive as well as the Takata reaction; the bilirubin blood level was normal in most cases.

There were no microscopical lesions of the gastric and intestinal mucosa or the parenchymatous organs. The histological examination revealed the elimination of the drug by the larger bile ducts and the renal tubuli; an accumulation of the oil (or sub-products) was also found in the Kupfer cells of the liver, which showed in most cases, a general vacuolisation of the parenchymatous cells. These findings have only a relative value, since also in

non-treated "normal" animals the structure of the liver cells indicated a slight degenerative process. The renal glomeruli and tubuli, heart, lung, gastric and intestinal mucosa showed a histologically normal structure.

*Agradecimentos* — É-nos grato deixar aqui consignados os nossos melhores agradecimentos a todos aquêles que tão desinteressadamente nos auxiliaram na realização dêste trabalho. Tais foram o Prof. Dr. Moacyr Amorim, pelos valiosos conselhos nas interpretações histológicas; Dr. A. Hoge, pelos testes funcionais de fígado, à Srta. Ingrid Hofstetter e Da. Maria Battaglia, pela confecção de cortes histológicos, ao Prof. Dr. H. Hauptmann e à doutoranda H. Rothschild, pela preparação das substâncias puras.

BIBLIOGRAFIA

1. *Duchèsne, E. A.* — Répertoire des plantes utiles. Jules Renouard, Paris, 1836.
2. *Dujardin-Beaumetz et Égasse, E.* — Les plantes medicinales indigènes et exotiques. Octave Doin, Paris, 1889.
3. *Dorland, N.* — The American illustrated medical dictionary. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, 1938.
4. *Penna, M.* — Dicionario brasileiro de plantas medicinais. Livraria Kosmos, editora, 3.a ed., pag. 27. Rio de Janeiro. 1946.
5. *Eichbaum, F. W.* — Biological properties of anacardic acid, cardol and derivatives. *Nature* (3988) :449. 1946.
6. *Eichbaum, F. W.* — Biological properties of anacardic acid (o-penta-decadienyl-salicylic acid) and related compounds, *Mem. Inst. Butantan,* **19**:69. 1946.
7. *Eichbaum, F W., Hauptmann, H. e Rothschild, H.* — Preparação e ação biologica do acido anacardico e de alguns derivados, *Anais da Ass. Quim. do Brasil,* **4**:83, 1945.
8. *Stoll, N. R.* — Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces, *Amer. Jour. Hyg.,* **3**:39. 1923.
9. *Rogres, W. P.* — Studies on the anthelmintic activity of hexylresorcinol and tetrachlorethylene, *Parasitology,* **36**:98, 1944.

# ESTUDO QUANTITATIVO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO ENTRE O ANTIVENENO CROTÁLICO E UMA FRAÇÃO PURIFICADA DO VENENO DA CASCAVEL NEOTRÓPICA (*CROTALUS T. TERRIFICUS*) (*)

POR OTTO G. BIER

*(Do Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

Em trabalho anterior (1), apresentamos alguns dados quantitativos referentes ao N precipitado de uma quantidade constante de antiveneno crotálico em presença de quantidades crescentes do veneno correspondente. Verificou-se, então, que o decurso da reação é muito semelhante ao que se observa no sistema toxina-antitoxina diftérica, não tendo sido possível, entretanto, calcular a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno, a qual só pôde ser avaliada indiretamente, admitindo-se a hipótese de que a fração do veneno precipitado correspondia á *crotoxina* de Slotta *et al* (2), existente na proporção de 60% do veneno bruto.

Prosseguindo nesta ordem de pesquisas, são referidos no presente trabalho os resultados das análises dos precipitados formados pelo antiveneno crotálico mediante a adição de quantidades crescentes de uma fração purificada, electroforeticamente homogênea, do veneno da *C. terrificus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Purificação do veneno.* Para a purificação do veneno foi utilizado um processo baseado na precipitação em pH próximo do ponto isoelétrico (4.4 a 4.6), tal como o usado por Slotta & Fraenkel-Conrat (2) para o preparo da crotoxina amorfa.

1 g. de veneno crotálico sêco, antigo, do estoque do Instituto Butantan, foi dissolvido em 12 ml de sol. N/10 de HCl, do que resultou um soluto opalescente,

---

(*) Trabalho realizado no Dept. of Medicine & Biochemistry, College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, com a ajuda de uma bolsa da "John Simon Guggenheim Memorial Foundation".

Recebido para publicação em 6 de dezembro de 1946.

ao qual se adicionaram 84 ml de $H_2O$ distilada. Após uma noite a 0°C separou-se por centrifugação o precipitado existente e ao sobrenadante, cujo pH era 4.37, adicionou-se suficiente sol. N/1 de NaOH para elevar o pH a 4.6 (electródios externos imersos na solução). Adicionando-se 2 ml de alcool etílico e resfriando-se o soluto por imersão do frasco em água com gêlo picado, desenvolveu-se imediatamente abundante precipitação. Depois de uma noite na geladeira, foi o precipitado separado por centrifugação em câmara fria e dissolvido em 10 ml de sol. 4% de NaCI, com a adição de gotas de sol. N/10 de NaOH, de maneira a assegurar um pH final próximo de 7.0.

A seguir foi o soluto transferido para um tubo de celofane e dialisado contra 500 ml de sol. 4% de NaCl tamponada com fosfatos a pH 7.4, com mudança diária do líquido de diálise, durante 4 dias, a 0°C. O soluto dialisado, após centrifugação enérgica em centrífugo de ângulo, deixou separar apenas um pequeno resíduo insolúvel e um líquido sobrenadante perfeitamente límpido. Teor de N (micro-Kjeldahl): 1.44 mg por ml, ou seja, em proteina, 0.9%.

*Verificação da pureza da fração isolada.* O soluto acima foi analisado electroforeticamente em aparelho tipo Tiselius (3): apenas 1 componente foi observado.

*Determinação da toxicidade.* Feita mediante a injeção intraperitonial em camundongos de 15-20 g. Nestas condições, a nossa solução de "crotoxina" (*) mostrou uma D.L.M. compreendida entre 0.11 e 0.055 de gama, ao passo que uma solução de veneno bruto se mostrou capaz de matar os camundongos em dóse próxima de 0.25 de gama. Convém salientar que tais determinações prescindem de rigor pois são baseadas em pequeno número de animais e é pertinente lembrar que os valores acima registrados não podem ser comparados aos observados por Slotta & Szyszka (4), que utilizaram a via subcutânea.

*Análise dos precipitados específicos.* Quantidades crescentes de "crotoxina", representadas por 1 ml de diferentes diluições foram adicionadas a uma série de tubos contendo 1 ml de sôro anti-crotálico (antiveneno do Instituto Butantan, cavalo n.º 213; 10 ml — 9 mg de veneno). Após 24 horas ou mais de permanência na geladeira, foram os precipitados separados por centrifugação em centrífuga refrigerada e lavados três vezes com porções de 3 ml de água fisiológica gelada.

---

(*) Por economia de expressão a palavra "crotoxina" será usada para denotar a fração purificada do veneno crotálico referida no presente trabalho. A identidade entre esta fração e a proteina obtida em estado cristalino por Slotta *et al.* requer, todavia, verificações adicionais.

As determinações de N foram feitas por uma modificação do método micro-Kjeldahl, recebendo-se a amônea acarretada por uma corrente de vapor d'água em solução de ácido bórico com indicador e titulando-se diretamente com HCl N/70. Análises em duplicata, tolerando-se apenas diferenças de 10 a 15 gamas.

## RESULTADOS

Pode-se ver na Tabela I que quantidades de "crotoxina" compreendidas entre 450 e 644 gamas deram valores de N precipitado praticamente iguais, isto é, com diferenças compreendidas dentro dos limites do êrro experimental. Os tubos correspondentes a 700, 800 e 900 gamas de "crotoxina" não deram valores satisfatórios para as análises em duplicata, o que se deve, sem dúvida, ao fato que, na zona de inibição por excesso de antígeno, a precipitação não é completa após uma noite de permanência na geladeira.

Com efeito, os sobrenadantes dos tubos correspondentes a 800 e 900 gamas eram distintamente opalescentes, e assim permaneceram mesmo quando se prolongou a 2 horas o tempo de centrifugação.

TABELA I

*Floculação quantitativa do sôro crotálico 213 por quantidades crescentes de "crotoxina", após uma noite a 0°C.*

| "Crotoxina" | | N/70 HCl | | N precipitado por 1 ml de sôro | N-antiveneno | Ratio N-antiveneno / N-veneno |
|---|---|---|---|---|---|---|
| proteina | N | | | | | |
| gamas | | ml | | gamas | gamas | |
| 450 | 72 | 4.94 | 4.90 | 984 | 912 | 12.6 |
| 500 . | 80 | 5.08 | 5.14 | 1022 | 942 | 11.8 |
| 550 | 88 | 5.06 | 5.09 | 1006 | 918 | 10.4 |
| 600 | 96 | 4.96 | 4.92 | 988 | 892 | 9.3 |
| 700 | 112 | 4.75 | 4.37 | | | |
| 800 | 128 | 2.93 | 2.04 | | | |
| 900 | 144 | .16 | .40 | | | |

Uma segunda série de determinações foi, por isso, efetuada deixando-se completar a precipitação durante oito dias na geladeira (tabela II).

### TABELA II

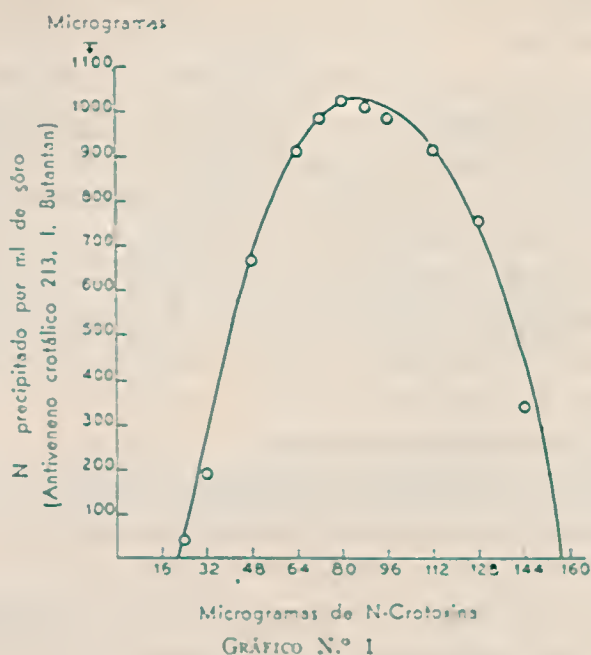
*Floculação quantitativa do sôro crotálico 213 por quantidades crescentes de "crotoxina", após 8 dias a 0°C.*

| "Crotoxina" | | N/70 HCl | | N precipitado por 1 ml de sôro | N-antiveneno | Ratio N-antiveneno / N-veneno |
|---|---|---|---|---|---|---|
| proteína | N | | | | | |
| gamas | | ml | | gamas | gamas | |
| 50 | 8 | 0 | 0 | 0 | | |
| 100 | 16 | 0 | 0 | 0 | | |
| 150 | 24 | .02 | .02 | 40 | | |
| 200 | 32 | .11 | .08 | 190 | | |
| 300 | 48 | 3.29 | 3.31 | 663 | | |
| 400 | 64 | 4.55 | 4.56 | 911 | 847 | 13.2 |
| 600 | 96 | 4.90 | 4.84 | 974 | 878 | 9.15 |
| 700 | 112 | 4.56 | 4.60 | 916 | 804 | 7.18 |
| 800 | 128 | 3.74 | 3.82 | 756 | | |
| 900 | 144 | 1.73 | 1.66 | 339 | | |

## DISCUSSÃO

Os resultados combinados das experiências referidas nas tabelas I e II vêm resumidos no gráfico N.° 1. A precipitação prolongada na geladeira, durante 8 dias permitiu estabilizar os valores de N-precipitado na zona de inibição por excesso de antígeno (700, 800 e 900 gamas de "crotoxina") e, presumivelmente, também na zona de inibição por excesso de anticorpo (150, 200 e 300 gamas). Os valores correspondentes aos pontos próximos da zona de equivalência (400 e 600 gamas) formam uma série coerente nas duas séries de experiências e, no que concerne a um ponto comum determinado em ambas as séries (600 gamas), os valores obtidos para o N precipitado (988 e 974 gamas) estão compreendidos dentro dos limites de êrro do método analítico empregado.

Há bom fundamento para afirmar-se que a zona de equivalência para o antiveneno estudado é muito próxima de 500 gamas de "crotoxina" per 1 ml de sôro. Com efeito, o máximo de N precipitado se observou com 500 e 550 gamas de "crotoxina" e, por outro lado, determinações feitas usando-se uma quantidade constante de veneno (1 ml de uma solução contendo 45 gamas de "crotoxina") em presença de quantidades variáveis de antiveneno, mostraram um ótimo de floculação, segundo Ramon, após um tempo de incubação de 20

GRÁFICO N.º 1

minutos á temperatura de 56°C, nos tubos correspondentes a 0,08 e 0.1 de sôro. Tomando-se como valor médio, 0,09 ml de sôro para 45 gamas de "crotoxina", cada ml de sôro corresponderá a $\frac{45}{0,09} = 500$ gamas de "crotoxina".

Verificações de toxicidade nos sobrenadantes foram feitas mediante a injeção de 0.5 ml no peritônio de camundongos de 15-20 g: ausência de "crotoxina" livre nos sobrenadantes correspondentes a 150, 400 e 600 gamas; morte imediata do animal injetado com o sobrenadante do tubo contendo 900 gamas de "crotoxina".

Mesmo em se admitindo, porém, uma zona de equivalência mais extensa, entre 450 e 600 gamas, as ratios observadas variam apenas entre 12.6 e 9.3 (ou 9.15) e confirmam, pois, as observações feitas anteriormente com soluções de veneno bruto (1).

No presente trabalho tais ratios foram calculadas diretamente dos valores de N dosados numa solução de "crotoxina" electroforeticamente homogênea.

Não foi possível, a exemplo do que fizeram Pappenheimer & Robinson (5) com a toxina diftérica, determinar por via imunológica a homogeneidade do antígeno utilizado, a partir dos valores de N precipitados de uma quantidade

constante de antitoxina. Nas experiências de Pappenheimer & Robinson foi possível observar que uma variação de 100 gamas na quantidade de N-toxina, dentro da zona de equivalência, é acompanhada de uma variação total de 100 gamas no teor de N precipitado, a qual se opera proporcionalmente á variação do antígeno. Tal não se logrou observar, entretanto, no sistema por nós estudado, em virtude de ser muito estreita a zona de equivalência (entre 450 e 550 gamas "crotoxina", ou sejam, 72-88 gamas de N-crotoxina). Dentro de tais limites, a variação observada no N precipitado foi de 38 gamas entre 72-80 e de 16, entre 80-88 gamas de N-crotoxina, de sorte que qualquer avaliação no sentido daquela feita por Pappenheimer & Robinson para o sistema toxina-antitoxina diftérica ficou obviamente prejudicada.

O essencial das verificações apresentadas no presente trabalho é a confirmação, por via direta, da ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno sugerida em trabalho anterior (*).

Atribuindo-se ao composto formado na zona de equivalência a composição molecular $GA_2$; ao antiveneno, o pêso molecular de 180.000 (o mesmo da antitoxina diftérica, não digerida, de cavalo) e á "crotoxina", o pêso molecular de 30.500 (**), a ratio esperada é de (2 x 180.000) : 30.500 = 11.8, que foi exatamente aquela observada no ponto de equivalência.

### RESUMO E CONCLUSÕES

1. Usando uma fração purificada, electroforeticamente homogênea, do veneno da *Crotalus t. terrificus*, foi possível determinar diretamente a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno crotálico.

2. Como se podia esperar, em virtude do pêso molecular da "crotoxina" (30-33000), tal ratio é próxima de 10, isto é, dupla daquela observada para a toxina diftérica (pêso molecular, 70.000).

---

(*) Uma revisão dos cálculos apresentados em (1) leva a uma pequena correção, em virtude de se ter atribuido o valor de 0.78 mg (e não de 0.88 mg) à quantidade de veneno crú contida per ml do soluto de veneno empregado naquelas experiências. Tal correção modifica apenas ligeiramente os valores obtidos para a ratio na zona de equivalência, os quais persistem muito próximos de 10, sem alterar, portanto, as conclusões apresentadas.

(**) Segundo as verificações de Gralén & Svedeberg (6).

ABSTRACT

1. By using a purified, electrophoretically homogeneous fraction from the venom of *Crotalus t. terrificus*, it has been possible to make a direct evaluation of the combining ratios between venom and antivenom.

2. As expected from the molecular weight of crotoxin (30-33000) the ratio at the equivalence zone is near 10, i.e., double of that observed for diphtheria toxin (molecular weight 70.000) with equine antitoxin.

Desejamos expressar os nossos agradecimentos aos Drs. M. Heidelberger e M. Mayer, do "Dept. of Medicine, College of Physicians & Surgeons, Columbia University", pelas valiosas sugestões apresentadas e pelo constante interesse que demonstraram durante a realização dêste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bier, O. G.* — Estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o anti-veneno crotálico. *Memórias do Instituto Butantan*, 18:27-32, 1945.

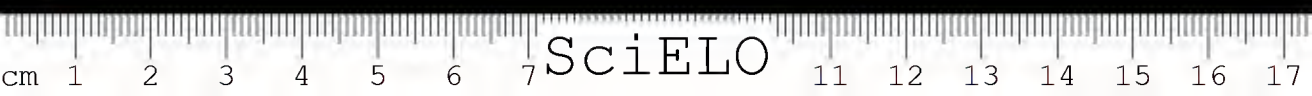
2. *Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — Estudos quimicos sôbre os venenos ofidicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel. *Memórias do Instituto Butantan*, 12:505-512, 1939.

3. *Bier, O. G. & Moore, D.* — Resultados não publicados.

4. *Slotta, C. H. & Szyszka, G.* — Estudos chimicos sôbre venenos ophidicos. 1. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Memórias do Instituto Butantan*, 11:109-119, 1937.

5. *Pappenheimer, A. M. Jr. & Robinson, E. S.* — Quantitative study of Ramon diphetheria flocculation reaction. *J. Immunol.*, 32:291-300, 1937.

6. *Gralén, N. & Svedberg, T.* — The molecular weight of crotoxin. *Biochem. J.*, 32:1375-1377, 1938.

Mem. Inst. Butantan,
20: 39-78, Dez.° 1947.



# PESQUISAS CARIOMETRICAS NO CICLO ESTRAL E GRAVIDICO (*)

*Pesquisas de citologia quantitativa: IV*

POR CARLOS ALBERTO SALVATORE (**) & GIORGIO SCHREIBER (***)

*(Do Laboratório de Citogenetica da Secção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

## INTRODUÇÃO

### a) *O problema do crescimento interfasico do nucleo*

O problema do crescimento do nucleo durante a interfase está sendo estudado por um de nós, ha alguns anos pela observação do volume nuclear nas células em atividade reprodutiva. Este problema apresenta notável interêsse, pois que as variações volumétricas do núcleo, embora dependentes de um grande número de fatores fisicos, fisico-quimicos e quimicos, está controlada pela atividade do genoma. O estudo do ritmo das variações deste volume durante a interfase pode fornecer algumas informações sôbre o ritmo da duplicação do genoma ou pelo menos, sôbre a variação quantitativa dos fenômenos fisicos e quimicos que o acompanham.

É necessario frizar que uma série de precauções de ordem teórica e técnica, têm que ser levadas em conta para um estudo dêsta natureza, afim de eliminar-se qualquer dúvida acêrca da legitimidade dos fenômenos observados.

A primeira destas precauções é o de esclarecer-se de forma absolutamente indubitável, a relação entre o valor quantitativo do genoma (múltiplos inteiros do número de cromosomas haploides) e o volume nuclear. O estudo dêsta correlação foi levado a termo por vários autores e mais recentemente por

---

(*) Comunicado à Sociedade de Biologia de S. Paulo, sessão de 9 de dezembro de 1946.

(**) Da Clinica Ginecológica da Escola Paulista de Medicina e do Instituto Butantan.

(***) Da Escola Livre de Sociologia e Politica de S. Paulo. Subvenção dos Fundos Universitários de Pesquisas.

Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1946.

Schreiber (10,12 e 13) que re-examinou o problema seguindo duas vias diferentes. Em primeiro lugar, com o estudo dos volumes nucleares em uma série de plantas de café, poliploides (22,44,66,88 cromosomas) (15): quando observadas algumas precauções técnicas no estudo cariométrico-estatistico, o volume nuclear é estritamente e diretamente correlativo ao número de cromosomas. Em segundo lugar, estudou a relação mútua entre o volume nuclear e o genoma dos núcleos da série espermatogenetica. Apesar deste estudo ter sido feito sôbre testículos de mamíferos e de insetos, por outros autores, Schreiber re-examinou ésta correlação nos ofidios (13) tomando em conta não sómente a série dos elementos meioticos mas, também o ciclo mitotico das espermatogonias, obtendo uma confirmação estremamente clara da correlação entre o volume nuclear e o valor múltiplo do genoma. Os volumes dos núcleos dos espermatocitos de 1.ª ordem, de 2.ª ordem e das espermatidias estão exatamente na relação 4: 2: 1. Nas espermatogonias, contrariamente ao que deveria ser em base ao número diploide de cromosomas, o volume (frequência máxima estatística) está constantemente a um valor triplo do valor dos núcleos haploides. A relação 1: 1,5 verificada entre os núcleos, indubitávelmente diploides dos espermatocitos de 2.ª ordem e os núcleos das espermatogonias é um fenômeno que como será exposto no curso deste trabalho, se encontra também nos núcleos em atividade mitotica das células uterinas.

Do conjunto das numerosas pesquisas cariométricas executadas nos últimos decenios pode-se concluir que o volume nuclear varia com valores descontínuos e proporcionais a uma série 1:2:4:8:16 etc. Este fenômeno está relacionado com a duplicação do genoma, que preside ao crescimento nuclear e portanto, a "ritmicidade" deste crescimento está perfeitamente explicada pela "atomicidade" da variação do genoma. Particularmente Biesele, Poyner e Painter, (1), em 1941, num estudo extensivo sôbre os volumes nucleares dos tecidos neoplásticos, insistem sôbre a natureza genética destas variações descontinuas do volume nuclear e, com base nas constatações do número de cromonemas e de cromosomas das células dêsses tecidos, frizam que nenhuma variação por embebição de água ou qualquer outro fenômeno puramente fisicoquímico por si só, poderiam explicar a variação dos núcleos de valores rigidamente múltiplos e perfeitamente coincidentes com o número de cromosomas ou de cromonemas (este último verificado com o número dos "organizadores do nucleolo" e com o volume dos cromosomas, individualmente).

Em outros casos a variação volumétrica dos núcleos é proporcional a série 1:1,5:2:3:4:6:8 etc. Como foi repetidamente indicado por Schreiber, ésta série, se integra perfeitamente com áquela dos múltiplos de dois, quando se considera o volume 1 como aquele dos núcleos diploides, e as variações se dão em função

dos múltiplos inteiros do valor básico haploide. Por êsta razão, o estadio nos quais os núcleos têm um valor múltiplo de 1,5 foi chamado com o termo de "sesquifase". A significação teórica deste tipo de variação volumètrica do núcleo parece ser de grande interêsse, pois a estrita correlação entre o volume nuclear e múltiplos do genoma estabelecidas nas numerosas pesquisas cariomètricas, induz a considerar como base dêsta variação, o genoma haploide (Schreiber) (12).

b) *Fim das pesquisas e plano do trabalho.*

As presentes pesquisas, integradas nos problemas acima expostos, têm por fim o estudo do crescimento nuclear, aproveitando os imponentes fenômenos de crescimento do utero nas diferentes fases da vida sexual, e ao mesmo tempo utilizar os fenômenos de variação quantitativa nuclear para elucidar vários problemas do ciclo estral e gravídico relacionados a fenômenos endocrinos.

O interêsse que êstas pesquisas apresentam deriva também da falta quasi total de exatas noções a respeito do mecanismo do aumento quantitativo das células uterinas. No que se refere ao endometrio, existe o trabalho de O'Leary (7) em material humano, cujas conclusões nos parecem pouco evidentes, pelo fato de evidenciar mais as modificações conjuntas do citoplasma e do núcleo, do que analisar mais detalhadamente e estatisticamente os fenômenos nucleares. A mesma falta de análise estatística pode-se notar nos trabalhos de Fabris (5), Stieve (16) e Frobose (6) sôbre as células musculares do utero.

O trabalho foi levado a termo sôbre os dois tecidos uterinos, endometrio e miometrio, considerando-os durante o ciclo estral, prenhez, na castração e éstro-continuo provocado pelos hormônios no castrado.

No presente trabalho serão considerados mais pormenorizadamente os resultados do ponto de vista cariomètrico e citológico, isto é, as variações fisiológicas do orgão considerados mais como meio de estudo das variações nucleares.

Em sucessivos trabalhos, serão analisados por Salvatore, os resultados mais sôbre o ponto de vista fisiológico e endocrinológico, isto é, considerando os fenômenos citològicos como um meio para esclarecer vários detalhes , problemas da fisiologia uterina.

MATERIAL E METODOS

A pesquisa foi realizada exclusivamente em ratas albinas da criação do Instituto Butantan (raça "BWB"). O estudo foi levado a termo com um rigoroso contrôle do ciclo vaginal, sendo cada animal sacrificado depois de tempos variados, quando apresentarem fases bem tipicas do ciclo vaginal.

O material foi sempre fixado em liquido Dubosq-Brasil e incluido em parafina. Foram realizados cortes com 10 micras, coradas com hematoxilina-eosina e hematoxilina de Heidenhain. Precisamos dar alguns breves esclarecimentos no que se refere a técnica cariométrica, enviando o leitor para maiores pormenores, aos trabalhos precedentes de Schreiber (1941-46) sôbre o assunto.

O fundamento do método estatístico-cariométrico, é baseado sôbre a constatação de que o núcleo passa por volumes progressivamente maiores, durante o crescimento interfasico. Porém, este crescimento não se efetua com velocidades constantes, mas como foi também verificado nas culturas de tecidos por Wermel e Portugalow (17), dá-se por ciclos sucessivos de velocidade maior alternadas com retardamentos ou paradas. Numa massa homôgenea de núcleos de um mesmo tecido em crescimento interfasico, os volumes alcançados serão representados por frequência tanto maiores quanto mais vagarosa é a variação do volume naquele instante do ciclo interfasico e vice-versa. As pausas de crescimento serão por conseguinte, representadas estatisticamente nas curvas de frequências dos volumes nucleares por valores modais distintos.

Esclarecida ésta premissa teórica, a determinação do volume nuclear se apresenta muito simples.

Nos cortes do utero, tanto transversais como longitudinais, foram desenhados com a câmara clara, na ampliação de 1.890 diâmetros, algumas centenas (200 a 300) de núcleos de uma determinada região homógenea, seja do endometrio como do miometrio. Neste último tecido foram sempre escolhidos trechos nos quais as fibras musculares se apresentavam rigorosamente paralelas ao plano do corte, com o fim de se evitar os erros de medição consequentes à inclinação dos núcleos.

Este problema é dos mais importante nas pesquisas deste tipo, pois pode-se medir o volume de núcleos de forma mais ou menos elipsoide sómente se temos absoluta certeza da sua orientação ($v = a^2b : 1.91$), com o eixo maior "b" paralelo ao plano do desenho. Si ésta condição não se verificar, é preferivel, entre certos limites bastantes restritos, considerar o núcleo como esférico tendo o diâmetro, igual a média aritmetica dos dois diâmetros (maior e menor) revelados no desenho. Todavia, ésta condição nunca se verifica para as fibras musculares cuja forma é sempre elipsoide muito pronunciada. No endometrio, pelo contrário, a diferença não é grande, e a medida como esferas pode ser realizada. Porém, temos que frizar que mesmo assim é preferivel escolher zonas de tecido nas quais a orientação seja controlável, porque as medidas calculadas como elipsoides dão maior garantia e revelam as vezes valores modais que nas medidas como esferas passam despercebidas.

No miometrio os núcleos apresentam-se rigidamente orientados no eixo longitudinal da fibra e quando escolhido o lugar oportuno com as fibras bem orientadas a medição não apresenta dificuldade. No endometrio devemos distinguir o epitelio interno do utero e as glândulas. Nestes, os núcleos são mais arredondados, e sòmente em cortes bem perpendiculares a superficie interna (Figs. 47 e 48) pode-se controlar a orientação destes núcleos, cujo maior diâmetro em geral apresenta-se em posição radial, com respeito a cavidade uterina. O mesmo se verifica nas glândulas, nos quais as células possuem os núcleos alongados segundo a direção radial do lume do canaliculo. Portanto, foram excluidas da medição todas as áreas em que a cavidade uterina aparece cortada em direção obliqua.

Para todas as medidas foram tabelados os valores dos dois diâmetros perpendiculares, e para cada núcleo, calculado o volume. Os volumes foram sucessivamente recolhidos em classes, cujo intervalo varia caso por caso. O intervalo será indicado nas tabelas I a VI. Tratando-se de um estudo de variações de volumes, o valor absoluto não têm muita importância. Portanto, os valores volumétricos são dados sempre em unidades cúbicas calculadas pelos diâmetros em milimetros á ampliação do desenho. Em todas as medições, um milimetro corresponde a 0,53 micra.

Construidos os histogramas de frequência com estes valores volumétricos, foi determinado o valor modal aplicando a formula $Mo = L + \frac{F}{F + f} . i$ na qual:

$L$ = é o limite inferior da classe modal.

$F$ = é a frequência da classe superior a classe modal.

$f$ = é a frequência da classe inferior a classe modal.

$i$ = é o intervalo de classe.

A escolha do valor modal como representante da população de núcleos, deriva das considerações acima citadas, sôbre a relação entre a frequência dos diferentes tamanhos alcançados no crescimento interfasico e a velocidade deste crescimento.

De particular interêsse se apresentava o estudo da frequência das mitoses nos diferentes tecidos uterinos em relação as fases da fisiologia uterina. Portanto para cada caso, foi calculado o index mitotico em % de mitoses sôbre os núcleos medidos. O problema das mitoses no utero e a sua significação, será discutido nas conclusões, relacionando-as com as variações volumétricas dos núcleos. A detalhada discussão da literatura sôbre este fenômeno será dada no trabalho seguinte de Salvatore.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) *Esclarecimentos gerais*:

No presente trabalho, para resumir a exposição dos resultados, damos na maioria dos casos as tabelas e os gráficos dos diferentes casos sob a forma de médias das observações de pelo menos tres casos homólogos estudados. Por exemplo, foram estudados tres animais no mesmo estadío de diestro. De cada animal foram medidos os volumes nucleares das glândulas uterinas. Obtidas as tres curvas de frequência, foi construida uma curva "média" com os valores médios (média aritmetica) das frequências de cada classe.

Portanto, denominamos "gráfico médio" aquele assim construido, ao passo que chamamos "gráfico individual" aquele original obtido com as médias de um só animal, como foi feito em certos casos. Nas tabelas serão indicados seja o número de animais de mesmo estadío juntamente agrupados, seja o número total de núcleos medidos para cada estadío (últimas colunas das tabelas I a VI).

As tabelas reunem as indicações de cada tecido (endometrio glandular, superficial e miometrio) durante o ciclo estral e prenhez. Dentro de cada tabela, os indivíduos estão agrupados conforme as diferentes fases do ciclo estral, gravidez, castração etc. Em cada tabela foi também indicado o index mitotico.

As modas foram calculadas com as curvas médias representadas nos gráficos. As figuras 44 e 45 (tab. VIII e IX) dão uma idéia bem evidente da variação dos volumes nucleares nas diferentes fases fisiológicas uterinas. A direita, nas ordenadas do mesmo gráfico foram indicados as médias aritmeticas dos valores modais. A figura 46 representa uma esquematização das variações das curvas de frequência nas diferentes fases uterinas, ao lado da representação gráfica do crescimento interfasico das divisões nucleares.

b) *Nucleos das glandulas*:

*O gráfico da Fig. 1.* Representa as frequências dos volumes nucleares de três indivíduos em diéstro. O histograma é unimodal, com moda a 664 e foi construido com um total de 631 núcleos. Nenhum dos três indivíduos apresenta mitoses. Este volume que é o menor dos volumes encontrados, adiante será por nós considerado como básico (moda I), e presumivelmente corresponde ao volume de um núcleo diploide.

*O gráfico da Fig. 2.* Representa a frequência dos volumes nucleares de três indivíduos em proéstro. O histograma possue 4 modas bem distintas que não desaparecem quando duplicado o intervalo de classe. Os três indivíduos considerados separadamente possuem as mesmas 4 modas, que se sobrepoem perfeitamente no gráfico das frequências médias aqui apresentados. A primeira moda coincide mais ou menos com a do diéstro, da Figura I (valor modal 738).

18-579

TABELA I

*CICLO ESTRAL*

*Endométrio glandular*

| N. da figura | Fase do ciclo | Valor modal I | Valor modal II | Valor modal III | Valor modal IV | VOLUME NUCLEAR 350 | 450 | 550 | 650 | 750 | 850 | 950 | 1050 | 1150 | 1250 | 1350 | 1450 | 1550 | 1650 | 1750 | 1850 | 1950 | 2050 | 2150 | 2250 | N. de indivíduos | N. total de nucleos | Média do índice mitótico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | diéstro. . . . | 664 | | | | 2,3 | 10,0 | 32,6 | 69,3 | 59,0 | 18,3 | 13,6 | 2,6 | 1,0 | 0,3 | | | | | | | | | | | 3 | 631 | — |
| 2 | proéstro . . . | 738 | 1036 | 1427 | 2016 | | 1,6 | 8,0 | 16,6 | 20,6 | 10,3 | 22,3 | 35,0 | 12,6 | 14,0 | 43,3 | 52,0 | 16,6 | 10,3 | 2,6 | 1,6 | 6,0 | 8,0 | 1,3 | 0,3 | 3 | 851 | — |
| 3 | éstro. . . . . | | 981 | 1423 | 2033 | | | 2,6 | 3,3 | 4,0 | 4,0 | 19,6 | 18,0 | 18,6 | 22,0 | 52,0 | 69,6 | 16,0 | 8,0 | 1 | 0,3 | 0,6 | 1,3 | 0,3 | | 3 | 725 | 6 |
| 4 | éstro-metaéstro . . . | 665 | 1056 | 1119 | | | 2,5 | 19,2 | 38,7 | 37,2 | 18,2 | 19,0 | 29,2 | 21,2 | 19,7 | 36,0 | 49,2 | 8,7 | 3,2 | 0,2 | | | | | | 4 | 1223 | 1,8 |
| 5 | metaéstro. . . | 653 | | | | 6,5 | 17,2 | 56,5 | 97,0 | 64,2 | 13,7 | 1,7 | 1,2 | | | | | | | | | | | | | 4 | 1045 | — |
| 6 | castrada . . . | 683 | | | | 5 | 7 | 15 | 100 | 77 | 10 | 3 | | | | | | | | | | | | | | 1 | 227 | — |
| 7 | éstro-continuo | | | 1420 | 1971 | | | | | | | | 1 | 9,0 | 28,0 | 59,0 | 85,5 | 15,0 | 8,0 | 0,5 | 1 | 3 | 2,5 | 1,5 | | 2 | 429 | — |
| 8 | post-éstro continuo. . | | 1039 | 1429 | 2000 | | | | 3,5 | 3,5 | 8 | 27,0 | 31,0 | 17,5 | 32,0 | 52,0 | 57,5 | 22,0 | 7,5 | 0,5 | — | 0,5 | 1,5 | — | | 2 | 528 | 0,75 |

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 1-8

Frequências dos volumes nucleares nas células glandulares uterinas.

A segunda moda é mais ou menos a um valor 1,5 maior do que a primeira (1036), e a terceira moda apresenta um valor duplo da primeira (1427). Uma IV moda é ligeiramente evidente a 2017.

Não foram encontradas mitoses, mas é evidente que os núcleos estão em crescimento interfásico, alcançando o volume duplo na grande maioria, e alguns até três vezes o volume da classe modal inicial (2017). Inicia-se nesta fase a infiltração leucocitaria no conjuntivo uterino, fenómeno este, que será analisado mais pormenorizadamente no trabalho sucessivo de Salvatore.

*O gráfico da Figura 3.* Apresentam as frequências de três indivíduos em éstro. O histograma mostra uma moda III a 1423, como valor fundamental, e outras modas secundarias correspondentes a II (981) e IV (2033) do histograma do proéstro. Isto significa que a máxima quantidade de núcleos alcança nesta fase o valor duplo do valor básico (1). Nesta fase aparecem mitoses (3,6% ) e além disso, grande infiltração leucocitaria e picnose nuclear. A curva foi construida com 3 indivíduos, em um total de 861 núcleos.

*O Gráfico da Fig. 4.* Representa a situação volumétrica durante o breve periodo entre o fim do éstro e o inicio do metaéstro ("éstro-metaéstro"). É bastante difícil encontrar ésta fase de transição, que nos foi possivel obter em 4 individuos cujo exame vaginal foi efetuado de duas em duas horas, em lugar de 24 horas como de costume.

O histograma é muito interessante pois apresenta bem nitidas as três modas que já foram encontradas no proéstro, com a diferença que tendo se verificado muitas divisões mitoticas, a moda I está aumentada em comparação com as outras. Os valores são respectivamente 665, 1056 e 1419. Nésta fase encontra-se ainda grande infiltração leucocitaria que invade até o lumen das glândulas, mitoses e várias células com núcleo picnotico e detritos cromáticos no lumen glândular. A curva foi construida com 4 individuos, com um total de 1223 núcleos.

*O gráfico da fig. 5.* Mostra a variabilidade dos volumes nucleares na fase de metaéstro (4 individuos; 1045 núcleos). O quadro que se apresenta é absolutamente demonstrativo pois encontram-se sómente núcleos pequenos da moda I como no diéstro.

A histologia do utero nesta fase é tipicamente de repouso, desaparecendo totalmente os leucocitos e faltando completamente as mitoses. É evidente que este quadro é determinado pela falta total de crescimento interfásico em todos os núclos de volume básico produzido nas mitoses do éstro. O desaparecimento dos núcleos grandes da Fig. 4, é devido em parte a dimidiação dos mesmos e, em parte, provavelmente aos fenómenos carioliticos do éstro e éstro-metaéstro.

TABELA II

*PRENHEZ*

*Endométrio glandular*

| Parte do utero | N. da figura | Dias de gravidez | Valor modal | | | | VOLUME NUCLEAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | N. de indivíduos | N. total de nucleos | Média do indice mitótico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | I | II | III | IV | 350 | 450 | 550 | 650 | 750 | 850 | 950 | 1050 | 1150 | 1250 | 1350 | 1450 | 1550 | 1650 | 1750 | 1850 | 1950 | 2050 | 2150 | 2250 | | | |
| Com feto | 9 | 7 | | | 1435 | | | | | | 1 | | | 7,5 | 9,0 | 31,0 | 50,5 | 62,0 | 28,0 | 7,0 | | | | | | | 2 | 392 | — |
| | 11 | 13-14 | 686 | 1026 | 1439 | | | 0,5 | 1,5 | 10,5 | 9,5 | 9,5 | 25,5 | 31,5 | 9,0 | 6,0 | 27,5 | 33,0 | 18,0 | 2,5 | | | | | | | 2 | 371 | — |
| | 13 | 20-21 | | | 1430 | 2002 | | | | | | | 1,6 | 3,6 | 20,0 | 31,3 | 53,6 | 83,6 | 23,3 | 9,3 | 5,0 | 3,6 | 2,6 | 5,0 | 1 | | 3 | 741 | 1,9 |
| Sem feto | 10 | 7 | | | 1437 | | | | | | | 0,5 | 8,0 | 14,0 | 14,5 | 17,0 | 37,0 | 50,0 | 22,0 | 9,0 | | | | | | | 2 | 341 | — |
| | 12 | 13-14 | 686 | 978 | 1427 | | | 1,0 | 2,0 | 16,5 | 13,0 | 4,5 | 17,5 | 16,5 | 9,5 | 18,0 | 40,5 | 41,0 | 15,0 | 3,0 | | | | | | | 2 | 396 | — |
| | 14 | 20-21 | | | 1426 | 1980 | | | | | | | 1,6 | 2,6 | 18,6 | 35,3 | 64,6 | 71,6 | 23,3 | 9,6 | 3,3 | 1,0 | 5,0 | 4,0 | 0,6 | | 3 | 725 | 1,7 |

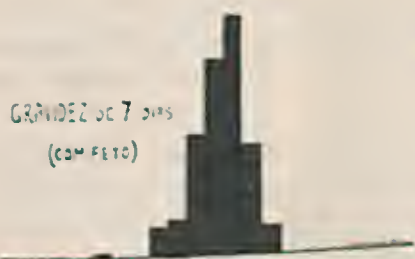
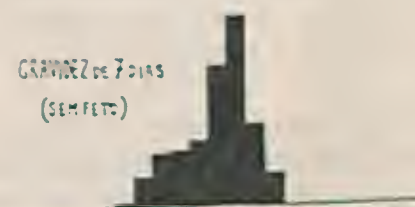
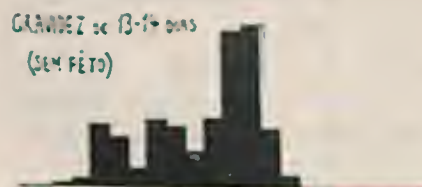
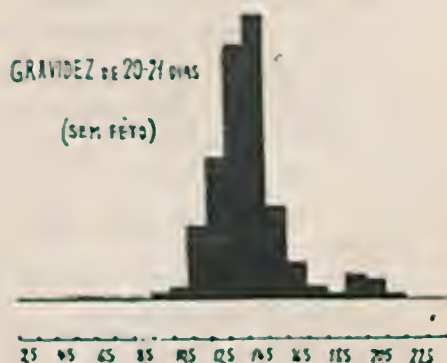



FIG. 9-14
Frequências dos volumes nucleares nas células glandulares uterinas

Além das diferentes fases do ciclo estral em condições fisiológicas foram estudados alguns individuos castrados e outros, também castrados, mas tratados com estrona.

*Os gráficos da Fig. 6 e 7.* Mostram os histogramas dos volumes nucleares nestas duas situações. A fig. 6 mostra que no castrado, todas as células possuem tamanho pequeno igual ao da moda I (683) do ciclo estral sem qualquer sinal de atividade reprodutiva.

A fig. 7, pelo contrário indica no castrado tratado com estrona, uma situação igual àquela do éstro com a totalidade dos núcleos em volume correspondente a moda III (1420) (volume duplo da moda I), além de uma nitida moda ao valor triplo do volume básico (I) (1971), embora de pequena frequência.

Nas glândulas desta fase não foram encontradas mitoses. O éstro contínuo obtido com injeções de 50 gamas de estrona diárias, e o animal sacrificado quando a situação do éstro era constante, isto é, 4 ou 5 dias após o início do tratamento. Portanto, ésta administração corresponde a cerca de 10 vezes mais da dóse mínima estrogenica.

*O gráfico da fig. 8.* Nos dá a situação dos volumes nucleares em 2 individuos tratados como os da Fig. 7, porém sacrificados 24 e 48 horas depois de suspenso o tratamento hormônico. O histograma mostra uma queda das frequências dos núcleos grandes e aumento dos de classes inferiores, com uma nitida moda II, e um notável aumento, embora não suficiente para determinar uma verdadeira moda, na região da moda I. Observa-se também a existência de um certo número de mitoses, apresentando ésta situação mais ou menos semelhante àquela do éstro-metaéstro (*).

O mesmo tipo de modificações que encontramos até agora nas fases do ciclo estral, foram encontradas no ciclo gravídico.

*As figs. 9 a 14.* Representam as curvas de frequência dos volumes nucleares das glândulas endometricas durante a prenhez. Devemos esclarecer que de cada fase foram estudadas as células da região do utero contendo o féto, separadamente daquelas sem féto. Isto devido ao eventual efeito da ação mecânica da distensão (parte com féto) sôbre o tamanho nuclear. Entretanto, as curvas

---

(*) Devemos aqui salientar que as transformações das curvas de frequência durante as fases sucessivas do ciclo fisiológico, pode ser produzida por dois mecanismos diferentes: 1) A transformação de um tipo celular corresponde a uma moda em outra, correspondente a outra moda. 2) A proliferação diferencial de dois ou mais tipos de células correspondentetes às modas diferentes e contemporaneamente existentes no tecido, desde o inicio em quantidades diferentes. A falta total de núcleos de tamanho III no diéstro, metaéstro e castrado, e de tamanho I no éstro-continuo indica o primeiro dos dois mecanismos aqui considerados, isto é, a transformação direta das células pequenas nas grandes. (Este fenómeno, já foi salientado por Schreiber desde 1940).

TABELA III

## CICLO ESTRAL

*Endométrio superficial*

| N. da figura | N. do protocolo | Fase do ciclo | VOLUME NUCLEAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | N. de Nucleos | Indice Mitótico | Infiltração leucocitaria |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | I | II | III | IV | 350 | 450 | 550 | 650 | 750 | 850 | 950 | 1050 | 1150 | 1250 | 1350 | 1450 | 1550 | 1650 | 1750 | 1850 | 1950 | 2050 | 2150 | 2250 | | | |
| 15 | 1 | diéstro. . . . | 726 | | | | | 2 | 8 | 39 | 48 | 14 | 5 | 3 | | | | | | | | | | | | | 119 | — | — |
| 16 | 12 | proéstro . . . | 656 | 1016 | 1435 | | 5 | 16 | 18 | 24 | 23 | 8 | 15 | 21 | 13 | 5 | 18 | 22 | 10 | 8 | 2 | | | | | | 207 | 0,8 | ± |
| 17 | 14 | éstro. . . . . | | | 1364 | 2073 | | | | | | 2 | 6 | 14 | 19 | 28 | 32 | 59 | 19 | 9 | 9 | 4 | 1 | 5 | 3 | | 220 | 3,5 | ++ |
| 18 | 32 | éstro-metaéstro . . . | 659 | 1119 | 1432 | | | 6 | 20 | 37 | 29 | 5 | 7 | 25 | 28 | 6 | 34 | 48 | 16 | 5 | 6 | 2 | | | | | 274 | 5,3 | ++ |
| 19 | 10 | metaéstro. . . | 644 | | | | 5 | 12 | 37 | 64 | 30 | 17 | 4 | | | | | | | | | | | | | | 169 | — | — |
| 20 | 18 | castrado . . . | 568 | | | | 5 | 26 | 60 | 53 | 15 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | 167 | — | — |
| 21 | 21 | éstro continuo | | | 1445 | | | | | | | | | 6 | 5 | 15 | 40 | 61 | 33 | 12 | 5 | | | | | | 176 | — | + |
| 22 | 24 | post-éstro-continuo. . | 644 | 1023 | 1441 | | | 7 | 10 | 15 | 8 | 8 | 16 | 26 | 3 | 5 | 32 | 47 | 15 | 5 | | | | | | | 199 | 4,7 | ++ |

Fig. 15-22
Frequências dos volumes nucleares nas células do endometrio superficial.

das duas regiões são absolutamente idênticas, indicando por conseguinte, que todas as modificações observadas no tamanho nuclear são devidas puramente a efeitos endocrinos sôbre o crescimento nuclear.

O exame comparativo das Figs. 9 a 10 e Figs. 11-12 nos mostram que mais ou menos na metade da gravidez, têm-se uma alteração da situação nuclear. Até o sétimo dia, existe uma situação perfeitamente parecida com aquela do éstro, tendo praticamente uma só moda ao valor duplo do valor básico (1437), ao passo que a 13-14 dias, a moda III diminue consideravelmente e aparecem novamente as modas I e II (respectivamente dos valores volumétricos 686 e 1026). O aparecimento dos núcleos menores simultaneamente com uma onda de mitoses (index mitotico 1,9%) nos faz pensar a um fenômeno semelhante a um éstro-metaéstro, análogo ao da fig. 4. A significação deste fenômeno de reprodução célular do utero da rata durante a prenhez, será também discutida nos trabalhos sucessivos de Salvatore.

Ao termo da prenhez, o quadro apresenta-se semelhante ao do éstro (figuras 13-14) com uma absoluta preponderância dos núcleos de volume duplo (moda III) (1426 e 1480) e pequena quantidade de núcleos de volume triplo (moda IV) mais ou menos 2000). Podemos portanto, pensar que houve crescimento interfasico das células pequenas formadas nas mitoses do 13-14 dias.

A pureza das curvas do ciclo estral nas fases finais, parece dar uma indicação certa que as variações efetuam-se na totalidade dos núcleos e, que a sincronia dos ciclos mitoticos destes núcleos é praticamente perfeita.

c) *Núcleos do endometrio superficial.*

Os gráficos que representam este tecido são todos construidos com os valores das frequências de únicos individuos, e não como nos casos precedentes, com as médias de 3 ou 4 individuos. Os gráficos das Figs. 15 — 16 — 17 — 18 — 19 (tabela III) representam as curvas de frequência nas fases de diéstro, proéstro, éstro, éstro-metaéstro e metaéstro respectivamente.

Os fenômenos observados são totalmente iguais àqueles dos núcleos do endometrio glândular. O diéstro têm uma só moda (I) ao valor 726 o que é ligeiramente mais alto de todos os valores modais deste estadio em outros casos. O proéstro apresenta três nitidas modas (I, II, III) aos valores respectivamente de 656, 1046 e 1435.

O éstro têm uma moda (III) predominante a 1364 e uma menor a 2075 (IV). Na região da moda II a curva denota uma ligeira assimetria que poderia ser uma moda II encoberta. Neste estadio são frequentes as mitoses com um index de 3,5%.

Tabela IV

*PRENHEZ*

*Endométrio superficial*

| Parte do utero | N. da figura | Dias de gravidez | Valor modal | | | | VOLUME NUCLEAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | N. de Nucleos | Indice Mitotico | Infiltração leucocitária |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | I | II | III | IV | 350 | 450 | 550 | 650 | 750 | 850 | 950 | 1050 | 1150 | 1250 | 1350 | 1450 | 1550 | 1650 | 1750 | 1850 | 1950 | 2050 | 2150 | 2250 | 2350 | | | |
| Com fêto | 23 | 7 | | 1061 | 1432 | | | | | | | 4 | 10 | 20 | 16 | 20 | 42 | 60 | 20 | 5 | | | | | | | | 197 | — | — |
| | 25 | 13 | 657 | 1050 | 1431 | 1933 | 2 | 3 | 9 | 23 | 12 | 10 | 10 | 19 | 10 | 13 | 31 | 40 | 14 | 10 | 2 | 2 | 6 | 1 | | | | 217 | 4,3 | + |
| | 27 | 20 | | | 1441 | 1937 | | | | | | | | | 5 | 12 | 30 | 74 | 24 | 24 | 13 | 5 | 10 | 3 | | | | 200 | — | + |
| Sem fêto | 21 | 7 | | | 1437 | | | | | | | | 5 | 10 | 10 | 21 | 38 | 55 | 23 | 7 | | | | | | | | 172 | — | — |
| | 26 | 13 | 654 | 1037 | 1430 | 1900 | | 2 | 5 | 15 | 6 | 8 | 10 | 25 | 6 | 11 | 28 | 35 | 12 | 7 | 5 | 1 | 3 | | | | | 182 | 3,1 | ++ |
| | 28 | 20 | | | 1443 | 1966 | | | | | | | | | 2 | 10 | 26 | 62 | 60 | 13 | 8 | 1 | 5 | 2 | | | | 149 | 1,7 | + |

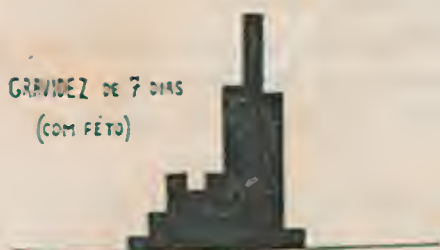
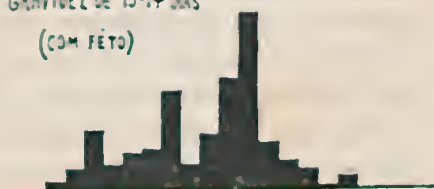
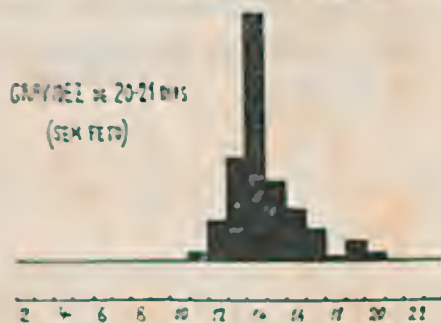



FIG. 23-28
Frequências dos volumes nucleares nas células do endométrio superficial.

No éstro-metaéstro reaparecem as modas e e II bem nitidas, respectivamente aos valores de 659 e 1119, e uma moda III a 1432. As mitoses alcançam a maior percentagem verificada, isto é, 5,3%, o que explica claramente o reaparecimento dos valores modais pequenos. No metaéstro volta a situação de repouso com uma curva regular unimodal I a 644 e falta totalmente as mitoses. Os núcleos deste tecido durante o diéstro e éstro, estão representados nas Figs 47 e 48.

No castrado (Fig. 20) a situação é perfeitamente igual ao do diéstro e do metaéstro: curva perfeitamente unimodal (I) (568). Esta moda porém, é um pouco menor da dos outros casos. No éstro-contínuo (Fig. 21) os núcleos estão todos ao valor da moda III (1445) exatamente como no éstro fisiológico. A suspensão do tratamento hormônico faz aparecer um abundante número de mitoses (4,7%) e as modas dos volumes inferiores (modas I e II, respectivamente 644 e 1023) (Fig. 22).

Na gravidez (tabela IV) os gráficos das figs. 23 e 24 mostram que nos primeiros dias, os núcleos estão predominantemente no volume da moda III (1432) com pequena moda II a 1061. Ao fim da gravidez (Figs. 27 e 28) os núcleos alcançam em pequeno número os valores da moda III como no começo. Ao 13-14 dias, como nas glândulas, também aqui, aparecem o ciclo mitotico (Figs. 25 e 26) (index mitotico de 3,4%), e toda a série de valores nucleares do crescimento interfasico (modas I — II — III).

Como já salientamos para o endometrio glândular, as medidas e as respectivas variações são perfeitamente iguais nos segmento uterinos com féto como nos sem féto.

d) *Núcleos das células musculares do miometrio.*

Para as células musculares lisas do miometrio, também as modificações nucleares apresentam-se com uma clareza notável que evidencia fenômenos de ordem multiplicativos tanto mitoticos como endomitoticos.

As fases do ciclo estral são representadas pelas Figs. 29 a 32 (tabela V) nos quais observa-se que possuem valores modais do volume nuclear bem nitidas e diferentes. Assim, na Fig. 29 a curva de frequência (média de três individuos) do diéstro têm uma moda única de valor que chamamos "básico" (I) (424). No proéstro (Fig. 30) aparecem as modas II (626), III (863) e IV (1168), que nos indicam que os núcleos alcançaram os valores volumétricos de 1,5, 2 e 3 vezes aquele do diéstro.

TABELA V

*CICLO ESTRAL*

*Miométrio*

| N. da figura | Fase do ciclo estral | Valor modal I | Valor modal II | Valor modal III | Valor modal IV | 225 | 275 | 325 | 375 | 425 | 475 | 525 | 575 | 625 | 675 | 725 | 775 | 825 | 875 | 925 | 975 | 1025 | 1075 | 1125 | 1175 | 1225 | 1275 | 1325 | N. de indivíduos | N. total de núcleos | Índice Mitótico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | VOLUME NUCLEAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 29 | diêstro | 424 | | | | 2,0 | 11,3 | 31,3 | 61,6 | 99,6 | 61,0 | 10,0 | 3,0 | 2,6 | 0,6 | | | | | | | | | | | | | | 3 | 851 | — |
| 30 | proêstro | 432 | 626 | 863 | 1163 | | | 1,0 | 7,0 | 28,6 | 16,3 | 5,0 | 17,0 | 28,0 | 19,0 | 13,3 | 15,0 | 42,0 | 46,3 | 15,0 | 3,0 | 0,6 | 0,3 | 1,3 | 2,6 | 0,6 | | | 3 | 791 | — |
| 31 | êstro | | 637 | 872 | 1168 | | | | | | 0,3 | 1,6 | 5,0 | 15,6 | 15,0 | 14,6 | 21,6 | 39,6 | 79,3 | 32,3 | 12,3 | 4,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 6,0 | 1,6 | 0,3 | 3 | 865 | — |
| 32 | êstro-metaêstro | 358 | 670 | 867 | 1130 | 1,5 | 4,2 | 11,2 | 46,2 | 37,5 | 12,2 | 3,0 | 2,2 | 7,2 | 8,2 | 5,2 | 10,2 | 28,5 | 49,5 | 14,7 | 4,7 | 2,5 | 1,0 | 5 | 1,5 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | 4 | 1032 | 0,3 |
| 33 | metaêstro | 423 | | | | 5,2 | 15,2 | 27,0 | 44,7 | 89,7 | 41,2 | 9,2 | 4,2 | | | | | | | | | | | | | | | | 4 | 917 | — |
| 34 | castrado | 387 | | | | 4 | 10 | 25 | 90 | 74 | 17 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 222 | — |
| 35 | êstro-contínuo | | 678 | 857 | 1120 | | | | | | | | | 3,0 | 6,5 | 4,0 | 11,0 | 75,0 | 85,5 | 13,5 | 3,0 | 2,5 | 3,0 | 6 | 2,5 | 0,5 | 0,5 | | 2 | 433 | — |
| 36 | post-êstro-contínuo | 358 | 636 | 868 | 1128 | 1,5 | 1,5 | 3,0 | 11,5 | 10,0 | 5,5 | 2 | 8,0 | 34,5 | 22,5 | 4,5 | 8,0 | 24,5 | 48,0 | 14,0 | 6,0 | 1,5 | 5,0 | 7,5 | 6,5 | 1,5 | | | 2 | 454 | 0,2 |

TABELA VI

*PRENHEZ*

*Miométrio*

| Parte do utero | N. da figura | Dias de gravidez | Valor modal I | Valor modal II | Valor modal III | Valor modal IV | Valor modal V | Valor modal VI | 375 | 425 | 475 | 525 | 575 | 625 | 675 | 725 | 775 | 825 | 875 | 925 | 975 | 1025 | 1075 | 1125 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | VOLUME NUCLEAR | | | | | | | | | | | | | | | |
| Com fêto | 37 | 7 | | 664 | 869 | | | | | | | 0,5 | 3,0 | 16,5 | 32,5 | 6,5 | 23,0 | 40,5 | 45,0 | 26,0 | 11,5 | 9,0 | 3,0 | 2,0 |
| | 39 | 13-14 | 462 | 665 | 867 | | | | 0,5 | 4,0 | 9,5 | 3,0 | 9,5 | 17,5 | 21,5 | 8,0 | 19,5 | 33,0 | 51,0 | 17,5 | 9,0 | 3,0 | 1,3 | 1,0 |
| | 41 | 20-21 | | | 863 | 1182 | 1572 | 2245 | | | | | | | 2,2 | 5,7 | 15,2 | 34,5 | 36,2 | 18,2 | 12,2 | 8,2 | 5,2 | 6,2 |
| Sem fêto | 38 | 7 | | 660 | 862 | | | | | | | 1,0 | 3,0 | 9,5 | 9,5 | 4,5 | 9,0 | 35,5 | 56,5 | 11,5 | 6,5 | 2,0 | | |
| | 49 | 13-14 | 458 | 628 | 870 | | | | 1,5 | 2,5 | 3,0 | 0,5 | 12,5 | 19,5 | 17,0 | 4,5 | 7,5 | 18,0 | 35,0 | 13,0 | 7,0 | 4,0 | 1,0 | |
| | 42 | 20-21 | | | 835 | 1176 | 1612 | 2131 | | | | | | | 1,0 | 3,3 | 19,3 | 51,3 | 47,6 | 27,3 | 12,6 | 10,3 | 5,3 | 10,3 |

| Parte do utero | N. da figura | 1175 | 1225 | 1275 | 1325 | 1375 | 1425 | 1475 | 1525 | 1575 | 1625 | 1675 | 1725 | 1775 | 1825 | 1875 | 1925 | 1975 | 2025 | 2075 | 2125 | 2175 | 2225 | N. de indivíduos | N. total de núcleos | Média do Índice Mitótico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Com fêto | 37 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 438 | 0,1 |
| | 39 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 422 | 0,7 |
| | 41 | 12,7 | 11,6 | 5,0 | 2,5 | 1,7 | 0,7 | 1,0 | 4,7 | 8,2 | 3,7 | 1,0 | | 1,0 | 0,5 | | 0,2 | 0,5 | 2,5 | 0,7 | 4,2 | 5,7 | 1,0 | 3 | 829 | — |
| Sem fêto | 38 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 297 | — |
| | 49 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 291 | — |
| | 42 | 15,6 | 11,6 | 8,0 | 4,4 | 3,0 | 2,0 | 1,0 | 1,6 | 1,0 | 14,6 | 3,6 | 7,0 | 2,0 | | | 2,0 | 1,6 | 1,3 | 2,0 | 4,0 | 3,3 | 0,6 | 3 | 862 | 0,4 |

FIG. 32-34
Frequências dos volumes nucleares do miometrio..

Na fase de éstro (Fig. 31) o volume nitidamente predominante é o da moda III, isto é, duplo volume do diéstro (860). Existe ainda uma moda II ao valor 1.5 (626) vezes básico, mas de uma frequência inferior àquela do estadío precedente. Embora extremamente raras existem nesta fase algumas mitoses.

No éstro-metaéstro, Fig. 32 diminuem as frequências das modas superiores e reaparecem os núcleos pequenos do valor inicial (moda I) (388) que no éstro faltam por completo.

No metaéstro (Fig. 33) sómente encontram-se estes valores pequenos exatamente como no diéstro e, desaparecem totalmente os núcleos médios e grandes.

Éstas transformações das curvas de frequência são com toda probabilidade devida a um *efetivo ciclo interfasico* seguido por uma divisão. Embora as mitoses sejam muito raras, elas existem. Lembramos que em geral as mitoses no miometrio do utero foram demonstradas durante o ciclo estral por meio do acúmulo das metafases pela ação da colchicina, e normalmente elas se encontram muito raramente.

A existência de uma verdadeira multiplicação das células musculares do utero é ainda assunto discutido na literatura. Não queremos entrar nesta discussão, mas as modificações quantitativas dos núcleos perfeitamente múltiplas de um valor inicial (ritmicas), só podem indicar, como foi frizado na introdução, uma *atividade multiplicativa do genoma nuclear*. De fato, alguns núcleos, especialmente na fase de prenhez se encontram no volume 4 vezes o inicial, indicando com isto, uma situação octoploide ou politenicos (1600).

O que acontece depois, seja uma divisão mitotica ou stenotica ou uma degeneração, é um assunto que será estudado futuramente.

Iniciada no proéstro e adquirindo o acme no éstro, verifica-se entre as células musculares uma intensa infiltração leucocitaria. Este fenômeno, porém, não é especifico do miometrio, mas comum a todos os tecidos uterinos.

Nos indivíduos castrados (Fig. 34), as fibras musculares têm núcleos de tamanho pequeno igual àquele do diéstro e metaéstro. Neste ponto também o miometrio se comporta exatamente como o endometrio. Falta totalmente qualquer atividade multiplicativa, com ausência de formas médias e grandes. No castrado injetado com estrona (Fig. 35) os núcleos possuem um volume duplo do castrado não injetado. Interrompendo o tratamento hormonal, aparecem as outras modas como no éstro-metaéstro (Fig. 36) (tabela V).

Na prenhez de 7 dias (Figs. 37-38) (tabela VI), os núcleos apresentam 1,5 e 2 vezes o inicial (moda I e II) sendo o valor dois, o predominante.

Fig. 35

Fig. 36

Fig. 37

Fig. 38

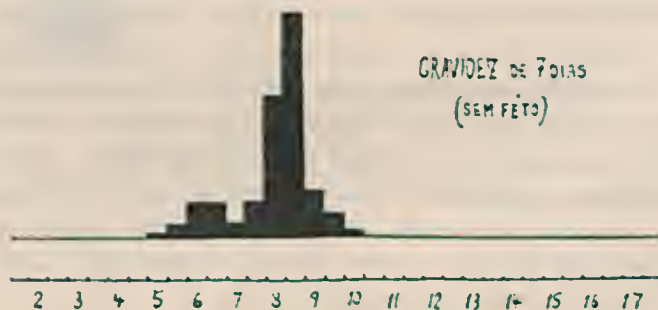



Fig. 35-38
Frequências dos volumes nucleares do miometrio..

É importante lembrar que nas nossas pesquisas, o volume nuclear é absolutamente independente do efeito da distensão mecanica provida pela presença do embrião embora as experiências de Reynolds (9) no coelho demonstram um efeito hiperplástico.

Aos 13-14 dias (Fig. 39) reaparecem os núcleos pequenos da moda I e os da moda II aumentam de frequência, correspondendo a uma situação de éstro-metaéstro. Como no endometrio, também aqui parece haver um ciclo mitotico neste periodo da gravidez. Apresentamos nas Figs. 51 e 52 duas micro-fotografias de células musculares em mitoses. A diminuição relativa das frequências dos núcleos grandes e a presença de mitoses apezar de rara nos induz a insistir sôbre ésta interpretação.

No 20° dia de prenhez (Figs. 41 e 42) o quadro cariométrico apresenta-se muito interessante: desaparecem por completo os núcleos pequenos e predominam os de tamanho duplo. Aumentam os de tamanho 3 (moda IV) e aparece uma pequena quantidade de núcleos de tamanho 4 e até 6 vezes o inicial (moda V — octoploides ?):

Salientamos ainda que nas células musculares como nas epiteliais do endometrio, o aumento ritmico do núcleo efetua-se por pulos de 1,5 vezes o inicial ("sesquifase"), e é conveniente lembrar que este fenómeno aparece claramente tanto nos núcleos quasi esféricos das células epiteliais, como nos núcleos fortemente elipsoides do miometrio. Portanto, qualquer dúvida sôbre a sua natureza devido a fatores técnicos não têm fundamento.

### d) *O volume da profase.*

No problema do crescimento interfasico do núcleo, o volume alcançado pelo núcleo no momento da profase é particularmente interessante, pois representa o fim deste crescimento.

As profases nos tecidos como o epitelial monoestratificado do endometrio apresentam-se com orientação variável, e a sua medida como elipsoide de rotação é sujeita a erros muito evidentes. Além disso, o estado de embibição do núcleo profasico parece maior do que o núcleo interfasico representando um fator de alteração da relação volume nuclear e por consequinte, o valor do genoma.

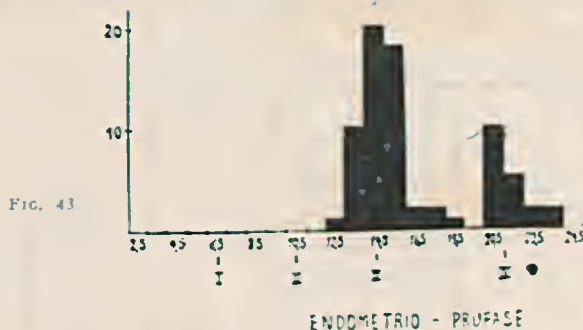
Apesar destas dificuldades, aproveitamos um número bastante grande de profases observadas em certos estadios do ciclo estral e na gravidez, suficientes para se fazer um ensaio da variabilidade estatística destes núcleos. Estas medições estão resumidas na tabela VII e no gráfico da Fig. 43.

FIG. 39-42
Frequências dos volumes nucleares do miometrio..

Embora, baseado sôbre um número pequeno de medidas, nos parece bastante evidente o agrupamento dos valores volumétricos das profases ao redor dos mesmos volumes modais dos núcleos interfasicos, isto é, das modas III e IV. Este fato provavelmente indica que os valores deduzidos da curva das profases possuem certo valor interpretativo.

A moda III, de todas as curvas aqui analisadas, têm um volume duplo do volume que consideramos como o "básico" (moda I). Logo, o fato das profases terem em sua maioria o volume duplo do básico, fortalece a suposição de que houve uma duplicação do genoma na passagem do volume da moda I até III.

De outro lado, temos um certo número de profases ao volume mais ou menos de 2100 ou seja da moda IV. O interêsse que estas profases apresentam é possuirem o volume duplo da moda II, isto é, daquela definida como "sesquifase". Isto poderia significar que no processo de multiplicação do genoma a profase pode aparecer ou ao volume duplo ou aquele triplo do genoma diploide.

Fig. 43

Temos já esclarecido que o valor em redor de 1050 (moda II) não representa uma categoria de núcleos diferentes dos outros, e que tomaria a liderança de uma moda em certas fases do ciclo estral substituindo outros de outras modas, mas representa uma real fase de transição dos núcleos da moda e no seu crescimento interfasico. Tudo isto aparece claro no exame comparativo das diferentes curvas onde faltam por total os núcleos da moda II, isto é, nas fases do ciclo onde não há crescimento interfasico (castrado, di e metaéstro).

Destas observações podemos deduzir que os núcleos correspondentes a um volume de genoma hexaploide (ou seja três vezes o do volume básico diploide) podem se dividir iniciando uma profase regular, e não temos razões para duvidar que os produtos destas divisões sejam os núcleos de volume de moda II (1,5 o volume básico).

Este fenômeno pode explicar o aparecimento dos núcleos da moda II nas fases de transição (éstro-metaéstro, post-éstro provocado etc), mas não temos elementos para excluir que éstas modas II sejam também produzidas por núcleos dos ciclos interfasicos normais que se recomeçam nestas situações do ciclo estral. Estas possibilidades foram indicadas no diagrama esquemático da Fig. 44 com os trechos pontilhados.

A possibilidade de ciclos mitoticos em núcleos de tamanho múltiplo dispar do volume básico, foi discutida por Schreiber (12) e invocado para explicar a diminuição de volume ritmico por etapas de 1,5 vezes, no figado dos anuros durante o desenvolvimento larval.

Parece-nos que os fenômenos aqui observados possam dar maior valor a ésta explicação, a qual falta, ainda devemos portanto admitir uma verificação citológica em termos de cromosomas ou de cromonemas.

TABELA VII

*ENDOMÉTRIO*

*(valores modais)*

| | | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|---|
| Diéstro .................. | End. superf. | 664 | | | |
| | End. glandular | 726 | | | |
| Proéstro .................. | End. glandular | 738 | 1036 | 1427 | 2017 |
| | End. superf. | 656 | 1046 | 1435 | |
| Éstro ...................... | End. glandular | | 981 | 1423 | 2033 |
| | End. superf. | | | 1364 | 2075 |
| Éstro-metaéstro ............ | End. glandular | 665 | 1056 | 1419 | |
| | End. superf. | 659 | 1119 | 1432 | |
| Metaéstro ................. | End. glandular | 653 | | | |
| | End. superf. | 644 | | | |
| Castrado .................. | End. glandular | 683 | | | |
| | End. superf. | 568 | | | |
| Éstro continuo ............ | End. glandular | | | 1420 | 1971 |
| | End. superf. | | | 1445 | |
| Post-éstro continuo ......... | End. glandular | | 1039 | 1429 | 2000 |
| | End. superf. | 644 | 1023 | 1431 | |
| Gravidez 7 dias e com feto | End. glandular | | 1061 | 1435 | |
| | End. superf. | | | 1432 | |
| Gravidez 7 dias e sem feto | End. glandular | | | 1437 | |
| | End. superf. | | | 1437 | |
| Gravidez 13 dias e com feto | End. glandular | 686 | 1026 | 1439 | |
| | End. superf. | 657 | 1050 | 1431 | 1933 |
| Gravidez 13 dias e sem feto | End. glandular | 686 | 978 | 1427 | |
| | End. superf. | 654 | 1037 | 1430 | 1900 |
| Gravidez 21 dias e com feto | End. glandular | | | 1430 | 2002 |
| | End. superf. | | | 1444 | 1937 |
| Gravidez 21 dias e sem feto | End. glandular | | | 1426 | 1930 |
| | End. superf. | | | 1443 | 1966 |
| Média dos valores modais | | 665.5 | 1037.6 | 1428 | 1933 |
| Profases | | | | 1460 | 2100 |

TABELA VIII

*MIOMÉTRIO*
*(valores modais)*

| | I | II | III | IV | V | VI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Diéstro | 424 | | | | | |
| Proéstro | 432 | 626 | 863 | 1168 | | |
| Éstro | | 637 | 872 | 1168 | | |
| Éstro-metaéstro | 388 | 670 | 867 | 1130 | | |
| Metaéstro | 423 | | | | | |
| Castrado | 387 | | | | | |
| Éstro contínuo | | 678 | 857 | 1120 | | |
| Post-éstro contínuo | 388 | 636 | 863 | 1128 | | |
| Gravidez 7 dias c/ feto | | 664 | 869 | | | |
| Gravidez 7 dias s/ feto | | 660 | 862 | | | |
| Gravidez 13 dias c/ feto | 462 | 665 | 867 | | | |
| Gravidez 13 dias s/ feto | 453 | 628 | 870 | | | |
| Gravidez 21 dias c/ feto | | | 863 | 1182 | 1572 | 2245 |
| Gravidez 21 dias s/ feto | | | 835 | 1176 | 1612 | 2131 |
| Médias das modais | 420 | 651.5 | 863 | 1152 | 1592 | 2188 |

TABELA IX

*ENDOMÉTRIO*
*Frequência dos volumes das Profases*

| 1250 | 1350 | 1450 | 1550 | 1650 | 1750 | 1850 | 1950 | 2050 | 2150 | 2250 | 2550 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 10 | 20 | 18 | 2 | 2 | 1 | — | 10 | 5 | 2 | 2 |

ENDOMETRIO
O SUPERFICIE
Δ GLANDULAS
2000
1500
1000
500
VOLUMES
1985
1428
1037
665
MEDIAS VAL MODAL
D P E EM M
CICLO ESTRAL
C EC PEC
CASTRAÇÃO
DIAS 7 13 21
GRAVIDEZ COM FETUS

FIG. 44

MIOMETRIO
2000
1500
1000
500
VOLUMES
2188
1592
1152
863
651
420
MEDIAS
VAL MODAL
D P E EM M
CICLO ESTRAL
C EC PEC
CASTRAÇÃO
DIAS 7 13 21
GRAVIDEZ
O COM FETUS
Δ SEM FETUS

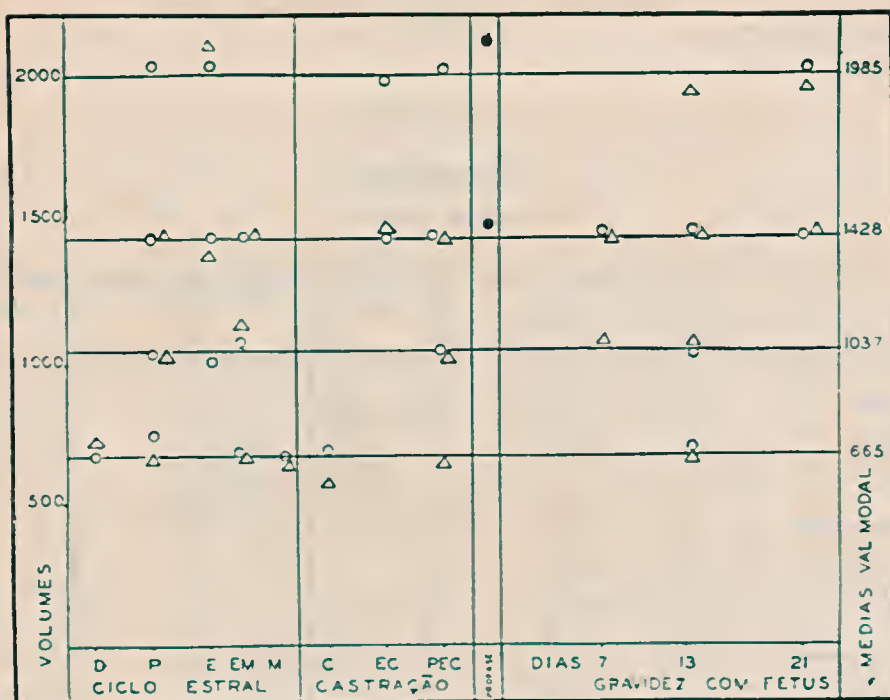
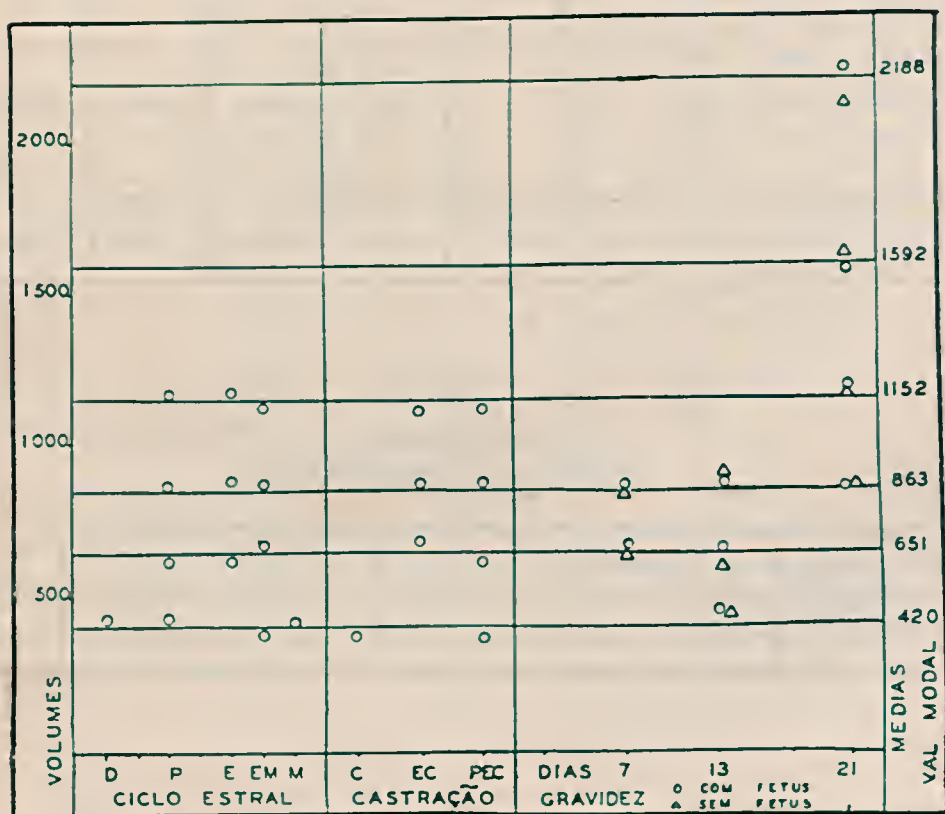



FIG. 45

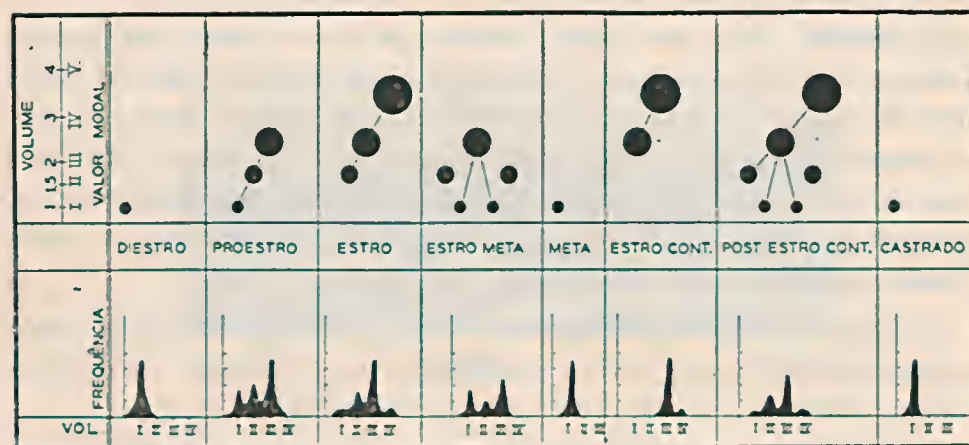



Fig. 46

Esquema das modificações das curvas de frequência dos volumes nucleares e dos correspondentes crescimentos interfásicos.

## 4) CONCLUSÕES

### a) *Conclusões citológicas.*

As variações do volume nuclear constatadas nas presentes pesquisas nos permitem tirar algumas conclusões que esclarecem vários problemas tanto no que se refere ao ritmo do crescimento nuclear por si mesmo, como no que se refere a participação da multiplicação célular nas variações fisiológicas do utero.

Do ponto de vista *citológico* evidenciaremos em primeiro lugar, que as variações de tamanho nuclear dos tecidos uterinos são todas tipicamente "ritmicas", isto é, proporcionais a um valor básico. Pelo que se conhece, com base ao conjunto de pesquisas cariométricas, significa que éstas variações de volume nuclear *efetuam-se por fenômenos de multiplicação do genoma nuclear*, e não por fenômenos assim chamados "troficos" ou de embibição.

O fenômeno mais tipico desta variação é a duplicação do volume nuclear em *todos os núcleos sincronicamente* na passogem de diéstro ao éstro. Este fato, como foi repetidamente esclarecido é um fenômeno de crescimento dos mesmos núcleos e não um efeito "estatístico" de predominância de classes de volume diferente em momentos sucessivos do ciclo estral. A falta total de

núcleos grandes no diéstro e no castrado, e dos núcleos pequenos no éstro e éstro-provocado, indica sem dúvida alguma, que são os mesmos núcleos que passam de um volume a outro. A verificação de que os núcleos duplicam exatamente de volume, que as profases possuem este volume, que nas fases sucessivas reaparecem os núcleos de volume dimidiados, indica de forma indubitável tratar-se de um ciclo multiplicativo das células em geral encontradas em sua totalidade nas mesmas fases deste ciclo. *Portanto, existe um ritmo de multiplicação célular relacionado com as fases do ciclo estral.*

A duração da interfase é geralmente menor do intervalo diéstro-éstro, sendo portanto provável que no proéstro se verifiquem para cada célula, mais do que um ciclo interfasico.

O resultado, é o aparecimento de todos os estadíos do crescimento interfasico e, as fases nas quais o crescimento é mais vagaroso são aquelas que apresentam os máximos de frequência, ou seja as modas I, II e III.

Nas fases extremas do ciclo estral (diéstro e éstro) os núcleos param respectivamente aos volumes das modas I e III. Evidentemente no diéstro e metaéstro existem condições que não permitem o crescimento interfasico e os núcleos depois de divididos na fase precedente não iniciam outra interfase acumulando-se ao volume I. No éstro, pelo contrário, todos ou quasi a totalidade dos núcleos, acabado o crescimento interfasico alinham-se sincronizados ao volume duplo (moda eII). No éstro fisiológico e experimental, e na gravidez é possível o crescimento interfasico além do intervalo de duplicação normal aparecendo por conseguinte, as modas IV e V que provavelmente representam núcleos éxa e octoploides.

Na passagem do éstro para o metaéstro dá-se algo que permite o aparecimento das mitoses e por consequinte voltam a aparecer os volumes inferiores das etapas do crescimento interfasico.

Outro fenômeno que aparece claramente nestas pesquisas é a assim chamada "sesquifase". As variações "ritmicas" do volume nuclear realizam-se por etapas proporcionais aos valores 1: 1,5: 2: 3: 4: 6: 8 etc., isto é, com valores proporcionais ao volume do núcleo haploide considerado como unidade de duplicação.

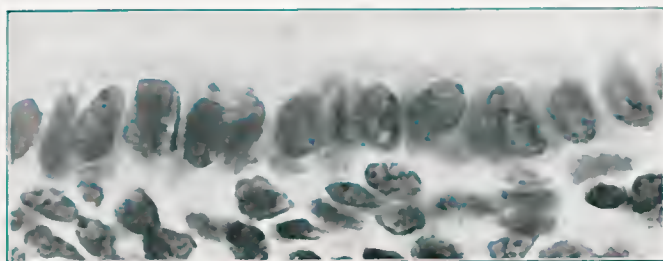



FIG. 47
Epitelio superficial do utero em diestro. x 1161.

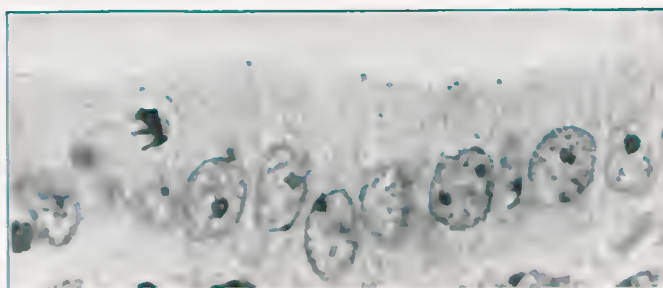



FIG. 48
Epitelio superficial do utero em estro. x 1161.

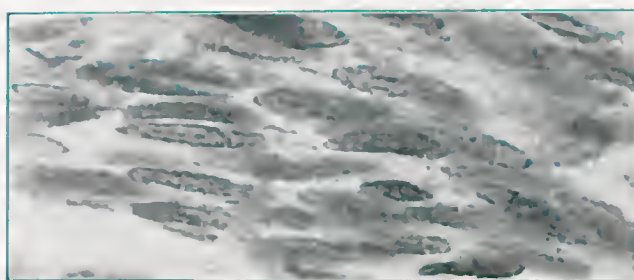



FIG. 49
Fibras musculares do miometro em diestro. x 1161.

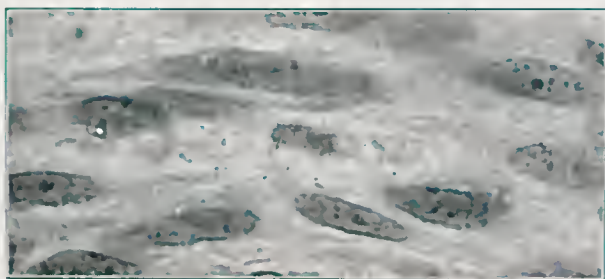



FIG. 50
Fibras musculares do miometro em estro. x 1161.

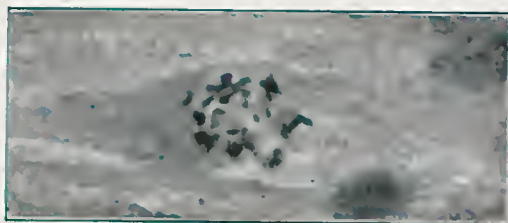



FIG. 51
Mitoses nas fibras musculares uterinas aos 21 dias de prenhez. x 1161.

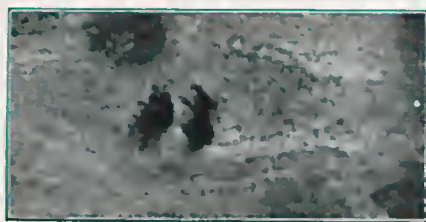



FIG. 52
Mitoses nas fibras musculares uterinas aos 21 dias de prenhez. x 1161.

Este resultado confirma os que Schreiber obteve no estudo cariométrico de outros tecidos em atividade reprodutiva (espermatogonias) e os que Wermel (17) e colaboradores constataram nas células cultivadas "in vitro" com pesquisas cinematográficas. Enviamos aos trabalhos anteriores de Schreiber a discussão e interpretação deste crescimento sesquifasico. Queremos sómente salientar algumas outras considerações que dão maior valor aos fenômenos aqui constatados.

A existência desta "sesquifase" manifesta-se nos tecidos uterinos com particular evidência. Especialmente nos gráficos 2,4,11,12,16,18,22,25,30 e 36, as modas estão perfeitamente distintas. Nos tecidos uterinos o estudo cariométrico nos evidencia claramente a natureza interfasica desta fase. Pelas considerações já feitas, sôbre a significação estatística das variações das curvas de frequência, devemos frizar também a propósito da sesquifase, isto é, da moda II, que as variações relativas as modas I e III especialmente confrontando o diéstro e castrado e o éstro natural e experimental, indicam que são consequentes a transformação dos núcleos de um valor a outro e não a predominância de núcleos de categorias diferentes pre-exitentes desde o inicio em épocas diferentes.

Portanto, neste caso, a sesquifase têm uma significação mais clara do que nos casos em que se compara tecidos diferentes segundo a natureza ou por época de desenvolvimento ou por condição patológica como aquelas notadas por Brummelkamp (2) e por Hertwig (8).

Nas células uterinas temos um caso, sob certo ponto de vista, tão favorável como o das espermatogonias, isto é, células em ciclo mitotico bem definidas e localizadas topograficamente, tendo algumas etapas deste ciclo distintamente marcadas por volumes fixos facilmente determináveis e com valor múltiplo do genoma conhecido. No caso da espermatogonia, estes marcos miliares de crescimento interfasico são representados pelos estadios das divisões meióticas, ao passo que nos tecidos uterinos, os marcos são representados pelos valores "básicos" que se encontram fixos nos estadios extremos do ciclo (diéstro, metaéstro e castrado). O outro marco limite, é aquele representado pelo volume das profases exatamente duplo do dos estadios de repouso agora mencionados. As variações dos valores modais nas fases intermediárias do ciclo estral e da gravidez, perfeitamente sincronizadas com o aparecimento das mitoses e com o aparecimento das modas que antes eram ausentes, permite interpretar corretamente a natureza interfasica do crescimento ritmico nuclear.

### b) *Conclusões fisiológicas.*

Sob o ponto de vista endocrinológico, o estudo detalhado dos fenômenos óra relatados, será publicado sucessivamente por Salvatore, porém, salientaremos algumas conclusões que interessam o estudo citológico uterino.

E primeiro lugar, podemos indicar que o ciclo fisiológico do éstro e da gravidez é acompanhado por manifestações citológicas em todos os tecidos uterinos constituidas por ciclos de multiplicação nuclear. A "hipertrofia" descrita por vários autores, ao menos no que se refere ao núcleo célular deve-considerar diretamente ligada ao crescimento interfasico do núcleo. Não estamos habilitados a concluir o mesmo para o citoplasma.

A castração deixa os núcleos absolutamente em repouso e perfeitamente sincronizados nesta fase, sem nenhum vestígio de crescimento interfasico. Portanto, a secreção ovariana age tipicamente sôbre o crescimento interfasico dos núcleos e ao iniciar-se a elevação do limiar désta secreção todos os núcleos iniciam uma série de ciclos interfasicos e de consequentes mitoses. Não podemos dizer qual é o fator que desencadeia a mitose propriamente dita, pois a a administração de estrona induz a maioria dos núcleos a ficarem no volume final do crescimento interfasico e acumularem-se nésta fase. A falta de núcleos pequenos nésta situação estaria a indicar que é necessario algum fator a mais do que o hormônio, ou alguma variação da situação hormônica para que as mitoses se produzam.

O efeito mais tipico da ação hormônica sôbre o ciclo de crescimento nuclear se revela nas duas situações opostas, isto é, na castração e no éstro-provocado. As variações destas situações provoca o "movimento" do ciclo nuclear e o aparecimento das fases intermediárias e das mitoses.

Além destas conclusões de ordem geral, podemos dizer que todos estes fenômenos de multiplicação nuclear, mitoticos ou endomitoticos efetuam-se também para as fibras do miometrio. O ciclo de crescimento interfasico dos núcleos é neste tecido tão evidente como no epitelio endometrial, embora as fases mitoticas sejam extremamente raras.

Outro fenômeno que evidenciamos nestas pesquisas é a presença de ciclos de multiplicação célular em todos os tecidos uterinos numa época mais ou menos a metade da gravidez. Este fato parece indicar uma variação da situação hormônica superposta ao estado gravídico, quiçá implicando ciclos funcionais ovarianos durante este estado.

Muitos problemas se abrem com estes estudos. Um dêles é o destino das células neoformadas pelos ciclos mitoticos uterinos. A infiltração leucocitaria e os notáveis fenômenos cariolíticos que verificam-se em certas fases, indicam que, ao menos parte das células em cada ciclo é destinada a morrer.

Qual dos elementos produzidos pela divisão são destinados a degenerar, e quais os que ficam para repetir o ciclo, constitue um dos problemas a serem esclarecidos.

A existência de núcleos de tamanho múltiplo do básico, interpretada por analogia com o que se conhece em outros tecidos (D'Ancona (3) (4) para o figado, e Painter (1) e colaboradores, para os neoplasmas), como poliploides, permite supôr-se que éste poliploidismo possa ser ligada à degeneração de parte dos elementos citológicos uterinos. Além disso, ésta labilidade nos limites da multiplicação do genoma durante os intensos fenômenos multiplicativos dos tecidos uterinos poderia estar ligada a incidência de neoplasmas neste orgão.

RESUMO

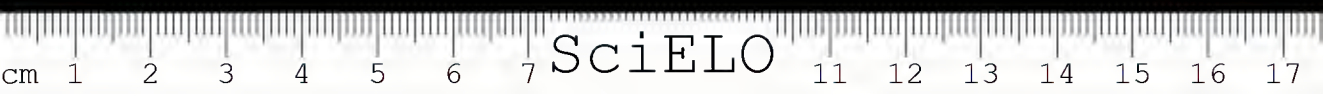
Foram estudados os volumes nucleares das células uterinas (endometrio, glândulas e miometrio) pelo método estatístico-cariométrico na rata, durante as fases do ciclo estral, gravidez, castração e no éstro-provocado pela estrona.

As variações das curvas de frequências dos volumes nucleares indicam que no ciclo estral as células que estão em repouso no diéstro, iniciam um crescimento interfasico alcançando no éstro o volume duplo do encontrado no diéstro, seguindo-se a divisão célular.

Durante este crescimento interfasico os núcleos apresentam uma etapa a 1,5 vezes o volume inicial. Este fenômeno verificado em inúmeros outros tecidos e em condições fisiológicas e patológicas das células, foi precedentemente definido por Schreiber com o nome de "sesquifase".

As profases iniciam-se geralmente a um volume duplo do inicial e, as vezes a um volume triplo ou seja o duplo da sesquifase. Uma pequena parte das células continua o crescimento interfasico alcançando um volume quatro ou seis vezes o inicial.

Na prenhez os núcleos apresentam um volume duplo daquele encontrado no diéstro. Ciclos multiplicativos verificam-se no meio da prenhez (13-14 dias).

Na castração, todos os núcleos estão na fase de repouso sincronizados ao volume inicial, igual ao do diéstro e sem nenhum vestígio de crescimento interfasico. No éstro-provocado (castrados, injetados com estrona) observa-se uma

situação identica àquela do éstro fisiológico. Ao se interromper o tratamento aparecem todas as classes de volumes inferiores (1: 1,5: 2), isto é, a presença do crescimento interfasico do núcleo.

Pode-se excluir que as variações das curvas de frequência, sejam devidas a um fenômeno "estatístico", isto é, a substituição em momentos diferentes, de categorias de núcleos diferentes pré-existentes no tecido. As variações perfeitamente sincronas e complementares das diferentes categorias de volumes nas diversas situações, e a sucessão cronológica destas variações, ligada com a presença das profases, não deixa duvida nenhuma que, as *diferentes classes de volume nucleares representam etápas do crescimento interfasico dos núcleos.*

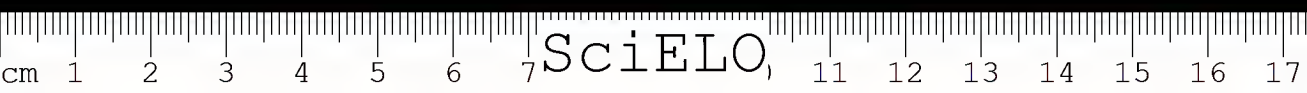
Todos estes fenômenos indicam que as fases fisiológicas uterinas sincronizadas com as variações hormônicas, estão nitidamente relacionadas a fenômenos multiplicativos dos genomas nucleares e com o mecanismo da mitose.


ABSTRACT

In this paper, statistic-caryometric methods have been applied to the measurement of the nuclear volume of uterine cells (endometrium, glands and miometrium) during the various phases of the oestral cycle pregnancy, after castration as well as during artificial oestrus induced by oestrone injections (rat).

The variations of the frequency curves of the nuclear volumes during the oestral cycle reveal an interphasic growth of those cells which are at rest during the diestric phase; these cells attain twice their initial volume, before they divide.

This interphasic growth of the nuclei has a rhytmical character which manifest itself by a distinct stop of growth (modal value of the frequency curve) when the nuclear size has reached 1,5 of its basic initial volume. This stage of arrest has equally been found in numerous other growing tissue cells in various normal and pathological conditions which have been studied extensively by various Authors. Schreiber termed in previous papers this fenomenon as "sesquiphase".

Nuclei in the prophase generally possess twice the basic volume and only occasionally three times the basic volume. A small part of the cells continues its interphasic growth without entering division which results in an increase of nuclear volume three to four times the basic volume (polypoid or polytenic nuclei).

During the oestrus there is a stop of the interphasic growth and an accumulation of double-sized (tetraploid?) nuclei. The succeding stage "oestrus-metaoestrus" reveals again all modal values corresponding to the interphasic growth and numerous mitosis.

The metaoestrus is characterized by a total absence of interphasic growth; all nuclei possess the basic volume.

The uterine cells of castrated rats reveal a nuclear picture perfectly behaviour as during the oestral phase; on the 13th day however a mitotic activity reappears and consequently the interphasic growth which follows the division. To the end of pregnancy the nuclei stop growing, after having reached a volume two, three or four times the basic value.

The uterine cells of castrated rats reveal a nuclear picture perfectly identical to the pro and metaoestrus: artificially induced oestrus determines the growth of all nuclei to the double the initial volume. Interruption of the treatment is followed by the appearance of mitosis and an succeding interphasic growth, exactly as in the physiological "oestrus-metaoestrus".

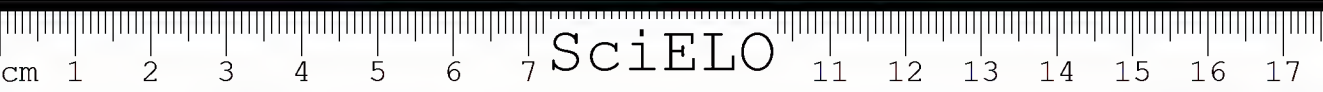
The sincronous transformation of the frequency curves and the total disappearance of the basic form at a stage where all the nuclei have reached the double volume does indicate that the variation consists in a real interphasic growth and not, as some authors believe, the existence of different cell categories of caracteristic nuclear size, which succeed each other during the various phases of the oestral cycle.

All these phenomena indicate that the hormons elaborated during the oestral cycle are active upon the nuclear interphasic growth as well as on the mitosis, affecting likewise myometric and endometric cells.

Agradecemos à Da. Nicolina Pucca, do Departamento de Farmacologia deste Instituto, pela valiosa colaboração no controle do ciclo vaginal das ratas.

BIBLIOGRAFIA

1. *Biesele, J. J.; Poyner, H. & Painter, T. S.* — Nuclear phenomena in mouse cancers. *The University of Texas Publication*, 4243:1-68, 1942.

2. *Brummelkamp, R.* — Das sprungweise Wachstum der Kernmasse. *Acta Neerlandica Morphologiae*, II(2):178-187, 1939.

3. *D'Ancona, U.* — Grandezze nucleari e poliploidismo nelle cellule somatiche, *Monit. Zool. Ital.*, **50**(8-9):225-231, 1939.

4. *D'Ancona, U.* — Sul poliploidismo delle cellule epatiche, *Boll. S. Ital. B. Sper.*, **16**(1): 49-50, 1941.

5. *Fabris, M.* — Le grandezze nucleari del miometrio, *Atti d. Soc. Med. Chir. di Padova*, marzo, 1935.

6. *Fröbose, H.* — Die Neubildung von Muskelzellen währendx der Tragzeit in der Gebärmutterwand der Hausmaus, *Ztschr. f. mikr. anat. Forsch.*, **37**:17-48, 1935.

7. *O'Leary, J. L.* — A quantitative study of the relation of nucleus to cytoplasm in the human endometrium during the menstrual cycle, *Anat. Record*, **50**:33-44, 1931.

8. *Hertwig, G.* — Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung, *Anat. Anz. Bol.*, **87** :65-73, 1938-39.

9. *Reynolds, S. R. M.* — Physiology of the Uterus, *P. Hoeber, Inc.*, 1939.

10. *Schreiber, G.* — Discontinous and proportional decreasing of nuclear size in the liver of tadpole during devolpment and metamorphosis, *Anat. Record.*, **87**(4) supp. 1941.

11. *Schreiber, G. & Schreiber, M. R.* — Diminuição do volume nuclear do fígado e do pancreas nos girinos de Anuros, *Boll. Fac. Fil. Cien. e Letras da Univ. S. Paulo, XXII Zoologia*, **5**:234-264, 1941.

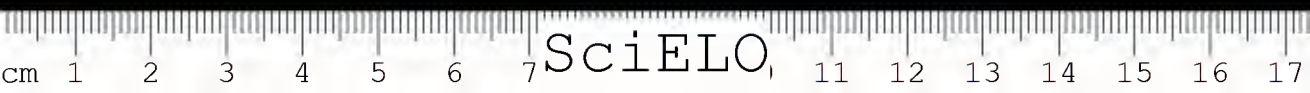
12. *Schreiber, G.* — O volume do núcleo durante o desenvolvimento e a interfase, *Rev. de Agricultura* (Piracicaba), **18**(11-12):453-474, 1943.

13. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. I. O crescimento interfasico da espermatogonia nos Ofidios, *Rev. Bras. de Biol.*, **6**(2):199-209, 1946.

14. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. II. A terceira divisão e a dimegalia da espermatogenese dos Ofidios. 1.ª Reunião Conjunta das Soc. de Biologia do Brasil (S. Paulo), set., 1946.

15. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. III. Pesquisas cariométricas sôbre os poliploides de Coffea. "*Bragantia*" (Inst. Agronômico de Campinas) em curso de publicação.

16. *Stieve, H.* — Die Neudilbung von Muskelzellen in der Wand der schwageren Gebärmutter, *Verhandl. Anat. Ges.*, **38**:27-35, 1929.

17. *Wermel, E. & Portugalow, W. W.* — Studien uber Zellengrosse und Zellenwachstum. XII. Mitt. Ueber d. Nachweeis d. Rhytmischen Zellenwachstums, *Z. Zellf. u. mikr. Anatomie*, **22**:183. 1935.

# AÇÃO DERMATOTÓXICA DE VENENOS OFÍDICOS E SUA NEUTRALIZAÇÃO PELOS ANTIVENENOS

POR F. W. EICHBAUM (*)

*(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

É fato conhecido há muito tempo que a injeção parenteral do sôro anti-*Bothrops jararaca* protege o indivíduo contra a ação tóxica geral (**) do mesmo veneno, mas praticamente não é capaz de prevenir o desenvolvimento de uma necrose local, mesmo quando o antiveneno for injetado pouco tempo depois da mordida dentro do próprio tecido atingido.

Para analisar esta falha da ação protetora local do sôro, estudamos no presente trabalho a ação dermatotóxica do veneno da *Bothrops jararaca* como também da *Crotalus terrificus terrificus* em relação aos antivenenos específicos, sob variadas condições experimentais.

## MATERIAL E METODOS

Como animais de experiência servimo-nos de coelhos e cães cuja pele abdominal era depilada pela aplicação de uma solução de sulfureto de sódio.

Os vários reativos (sôro, veneno, etc.) foram injetados com agulhas finas (N.º 24), intradermicamente, e as reações foram observadas em intervalos determinados.

## RESULTADOS

### *A.) Ação dermatotóxica (***) do veneno de Bothrops jararaca*

A ação dermatotóxica do veneno de *Bothrops jararaca* manifesta-se por 3 tipos diferentes de reação que têm certa relação com a quantidade do veneno depositado na pele.

---

(*) Estagiario.

(**) Chamaremos de "ação tóxica geral", o conjunto dos fatores que conduzem à morte dos animais em contraste com os fatores tóxicos discutidos detalhadamente neste trabalho.

(***) Preferimos falar neste trabalho de uma "ação dermatotóxica" dos venenos em vez de "hemorragina", termo usado por outros autores, visto que a hemorragina representa só *um* componente (fração) do complexo dermatotóxico total.

Entregue para publicação em 22 de janeiro de 1947.

1. *Edema* ("E")

   No caso de um edema muito forte e persistente o edema se transforma no 3.°-4.° dia num endurecimento (infiltração circunscrita da pele (infiltração = "I")

2. *Hemorragia* ("H")

3. *Necrose* ("N")

A próxima Tabela (N.º I) demonstra os vários tipos das lesões epidérmicas (no coelho) em relação à dose injetada.

TABELA I

*Dosagem da dose necrosante mínima (D. N. M.) do veneno de Bothrops jararaca, na pele do coelho* (1.500-2.000 *g*)

(Quantidade de veneno contido em 0.2 ml. Vol. total)

| Quantidade de veneno em mg | Reação depois de | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5' | 60' | 4 h | 24 h | 48 h |
| 0.6 | H ++ | H ++++<br>E ++++ | H ++++<br>E ++++ | N +++<br>E +++ | N +++ |
| 0.4 | H ++ | H ++++<br>E ++++ | H ++++<br>E ++++ | N +++<br>E ++++ | N +++ |
| 0.2 | H ++<br>E +++-- | H ++<br>E ++++ | H ++<br>E ++++ | N ++ | N ++ |
| 0.1 | H ± | H ++<br>E ± | H ++<br>E ± | H ++<br>E +++ | I + |
| 0.05 | E +−+− | H ±<br>H ++++ | H ±<br>E ++++ | I+ E++− | I + |
| 0.025 | E +−++ | H ±<br>E ++++ | H ±<br>E ++++ | E +++ | O |
| 0.020 | E ± | E ++ | E ++ | O | O |

*Nota*: No presente trabalho tôdas as indicações de "mg de veneno" se referem a mg de *venenos sêcos*, redissolvidos em salina isotônica.

*Leitura*: O = sem reação; H = hemorragia; E = edema; N = necrose; I = infiltração.

A dose necrosante mínima (D.N.M.) foi de 0.2 mg (numa outra experiência era de 0.4 mg). A dose edemaciante mínima (D.E.M.) foi somente de 15-20 gamas.

Doses intermediárias de cêrca de 0.1 mg produziram uma lesão hemorrágica que foi regularmente acompanhada de um forte edema. Acontecia, aliás, frequentemente, que com as doses produtoras de hemorragia, o edema aparecia

mais tarde do que aquêle que se manifestava após a injeção de quantidades menores de veneno. Pode-se talvez explicar êste fenômeno (edema retardado com maiores doses) por uma coagulação intravasal nos pequenos vasos que inibe a transudação; não desprezamos a possibilidade de colaborarem nesse fenômeno outros mecanismos, atuando ou diretamente, ou por via reflexa, sôbre os vasos periféricos.

A necrose que segue a injeção intradérmica de 0.2 — 0.6 mg era antecedida regularmente por uma intensa hemorragia e mostrava pleno desenvolvimento sonmente 24-48 horas após a injeção do veneno.

Quer nos parecer que as lesões hemorrágicas e necróticas dependem unicamente de diferenças quantitativas da mesma fração do veneno. Quanto ao edema, as experiências a serem descritas mais adiante, parecem indicar ser produzida por uma fração separada do mesmo veneno.

*Ação neutralizante do sôro anti-Bothrops jararaca sôbre a ação dermatotóxica do veneno de Bothrops jararaca*

Foram realizados 4 tipos de experiências:

1. *Proteção geral* do animal pela injeção intramuscular de uma dose maciça do sôro, seguida 24 horas após por uma injeção intradérmica do veneno.

TABELA II

| | Quantidade de veneno injetado (num volume total de 0.2 ml) | Reação depois de | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 10' | 30' | 3 h | 24 h |
| Coelho A | 0.6 mg | H ++ | H ++ | H ++<br>E ++ | N+ N+<br>E+ |
| | 0.4 mg | H ++ | H ++ | H ++<br>E ++ | N+ H++<br>E+ |
| (proteção geral) | 0.2 mg | H ± | H ± | H ±<br>E ++ | H± E++++ |
| | 0.1 mg | O | H ± | H ±<br>E ++++ | E ++++ |
| Coelho B | 0.6 mg | H ++ | H +++ | H +++<br>E ++ | N++ H+ |
| (Normal) | 0.4 mg | H ++ | H +++ | H +++<br>E + | N++ E+ |
| contrôle | 0.2 mg | H ± | H ± | H ± E+ | H± E+++ |
| | 0.1 mg | H ± | H ± | H +++<br>E + | H++<br>E++ |

2. *Proteção local* pela injeção intradérmica do sôro; injeção sucessiva do veneno, no mesmo lugar, após 3-5'.

3. Injeção intradérmica do veneno seguida, imediatamente, depois por uma injeção intravenosa de altas doses de antiveneno ("tratamento parenteral").

4. Injeção intradérmica do veneno, seguida por uma injeção de sôro no mesmo lugar, 3-5' após (tratamento local).

5. Injeção simultânea do veneno + sôro, que antes da injeção tinham ficado em contacto durante 30' a 37°C (*neutralização do veneno in vitro*).

TABELA III

| Tipo de experiência | Substâncias injetadas | Reação depois de | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 5' | 15' | 60' | 24 h |
| Contrôle sôro | Antiveneno (*) 2 ml *i. d.* | O | O | O | E +−++ (I) |
| Contrôle veneno | Veneno 2 mg *i. d.* (contidos em 2 ml de água fifsiol. | H + | H +++ | H ++++ | N ++++ E ++++ |
| Ad 2) Proteção local | Antiveneno (*) 2 ml *i. d.* Depois de 5' no mesmo lugar Veneno 2 mg | E ++ | E ++++ H ± | E ++++ H + | E ++++ H + |
| Ad 3) Tratamento parenteral | Veneno 0.8 mg *i. d.* Depois de 1' Antiveneno (*) 5 ml por via venosa | H ++ | H +++ | H +++ E ++ | N ++ H ++ E ++ |
| Ad 4) Tratamento local | Veneno 2 mg *i. d.* Depois de 4-5' no mesmo lugar Antiveneno (*) 2 ml | H + | H ++++ | H ++++ E ++ | N++ H+++ E ++ |
| Ad 5) Neutralização *in vitro* | Antiveneno (*) 2 ml Veneno 2 mg injetados após contacto durante 30' a 37° | O | E + | E ++ | E ++++ |

*i.d.* = intradérmica.

(*) Antiveneno = sôro anti-*Bothrops jararaca* No. 18: 2 ml deviam neutralizar 4.4 mg de veneno de acôrdo com adosagem em pombos (método de Vital Brazil).

(**) Os intervalos de 5', 15', 60' e 24 h contam-se do momento em que o veneno foi injetado.

Resultado das experiências em 17 coelhos de 1500 — 1800 g:

1. O coelho *A*, de 1.800 g recebeu por via venosa 2,5 cm3 do sôro antibotrópico (Op. 17), quantidade essa que, de acôrdo com a dosagem em pombos, devia neutralizar 4.75 mg de veneno. Vinte e quatro horas após, foram injetadas várias quantidades de veneno, em diferentes lugares. As reações observadas foram comparadas com as obtidas num outro coelho (B), não protegido pelo sôro.

Fóra de ligeiras diferenças, atribuiveis à reatividade individual dos dois animais, a pele do animal "protegido" e a do animal normal reagiram identicamente. *Conclusão*: a injeção parenteral do sôro não protege a pele contra a ação necrotica e quase comletamente a ação hemorragica do veneno, mas não excesso. (Tab. II).

2. A infiltração prévia da pele com antiveneno (*proteção local*) neutraliza a ação necrotica e quase completamente a ação hemorragica do veneno, mas não é capaz de neutralizar a ação edemaciante. (Tab. III).

3. *Tratamento parenteral*: — a ação hemorragica-necrotica e edemaciante do veneno praticamente não é influenciada pela injeção de altas doses de antiveneno, aplicadas poucos minutos após a injeção do veneno. (Tab. III).

4. *Tratamento local*: — Como em 3. —, também a injeção local de sôro no mesmo lugar onde o veneno era depositado, não influe sôbre a ação dermatotóxica do último. (Tab. III).

5. *Neutralização in vitro*: — o contacto *in vitro* do antiveneno com o veneno neutraliza a ação hemorragiconecrotica dêste último, mas diminui somente de pouco a ação edemaciante. (Tab. III).

*Contrôle de sôro*: — A injeção do sôro deixa notar depois de 24 h uma ligeira infiltração edematosa, diferente do edema pastoso observável nos outros animais tratados com veneno ou veneno mais sôro. (Tab. III).

Resultados análogos foram obtidos em dois cães:

1. *Proteção local por injeção prévia do sôro* (sôro antibotrópico No. 19: dosagem em pombos: 10 ml neutralizam 24 mg de veneno).

Cão No. 2, pêso 8 kg, injeção intradérmica na pele abdominal depilada de 2 ml de sôro (correspondendo a um valor neutralizante de 4.8 mg de veneno). Depois de 5', injeção de 0.2 ml = 1 mg de veneno botrópico (jararaca) no mesmo lugar. Paralelamente injetam-se em outro lugar da pele não tratada previamente e distante 15 cm do primiro, 0. 2. cm³ (= 1 mg de veneno).

| Tempo de observação, contado da injeção do veneno | Resultado | |
|---|---|---|
| | a) Infiltração prévia da pele com sôro, seguido por injeção de veneno | b) Veneno na pele não protegida (contrôle) |
| 5' | — | H ++ |
| 10' | E ++ | H +++ E +++ |
| 60' | E +++ | H ++++ E +++ |
| 4 horas | E ++++ H + | H ++++ E ++ |
| 24 horas | E ++ I + | N +++ E + |
| 72 horas | I ± | N ++ I +++ |

(O cão que depois de 1 hora apresentou evacuação sanguinolenta e forte abatimento, recebeu 10 ml de sôro, (*) o que fez desaparecer logo os sintomas gerais).

Como na experiência em coelhos a proteção local prévia protege só contra a ação necrosante do sôro, mas não é capaz de evitar o aparecimento do edema.

2. *Injeção intradérmica prévia do veneno seguida por uma injeção local do sôro*:

Cão No. 5, pêso 8 kg. O animal recebe em diferentes lugares da pele abdominal as seguintes injeções:

a) 1 mg de veneno botrópico (jararaca), contido em 0.2 ml de salina (contrôle).

b) 1 mg de veneno botrópico (jararaca), contido em 0.2 ml de salina, e depois de 3 minutos, 2 ml do sôro No. 19 no mesmo lugar.

c) como b, injetando-se, aliás 1 ml do sôro antibotrópico No. 19.

d) ml do sôro antibotrópico No. 19 (contrôle).

---

(*) por via intraperitoneal.

6

TABELA V

| Tempo de observação, contado da injeção do veneno | material injetado | | | |
|---|---|---|---|---|
| | a) veneno 1 mg i. d. (*) — | b) veneno 1 mg i. d. depois de 3' sôro 2 ml i. d. | c) veneno 1 mg depois de 3' sôro 1 ml i. d. | d) sôro 2 ml i. d. |
| | Reação | | | |
| 5' | H+ | H+ | H+ | — |
| 10' | H++ E+ | H++ E+ | H++ E− | 1+ |
| 60' | H+++ E+++ | H+++ E++− | H+++ E+++ | 1± |
| 4 horas | H+++ E++ | H++++ E+++ | H++++ E+++ | 0 |
| 24 horas | N+++ E+++ | N++++ E+++ | N+++ E+++ | 0 |
| 72 horas | N++++ | N+++− | N++++ | 0 |

(O cão que depois de uma hora apresenta sintomas fortes de uma intoxicação geral, recebe 10 ml de sôro i.p. (**) o que fez desaparecer logo os sintomas gerais).

Como nas experiências em coelhos, a ação necrosante do veneno não foi neutralizada pelo sôro, mesmo quando êste era injetado no mesmo lugar em que o veneno era depositado 3 minutos antes. (Notar que os 2 ml de sôro deviam neutralizar 4.8 mg de veneno). Nem a injeção adicional de uma grande dose de sôro aplicada por via venosa 1 hora depois da injeção de veneno modificou os resultados.

Pareceu ainda de um certo interêsse tanto teórico como prático, verificar-se a relação quantitativa entre a ação anti-tóxica-geral e a ação antidermatotóxica do sôro antibotrópico.

Realizamos uma série de experiências com o sôro (nativo) Op. 17, que deu para êste sôro uma certa aproximação entre a dose antineurotóxica (dosada em pombos) e antinecrosante-antihemorragica (dosada na pele abdominal de coelhos). Verificou-se mais uma vez nesta experiência a falta absoluta de um princípio antiedemaciante mesmo com doses elevadas do sôro. (cf. Tab. VI).

B.) *Ação dermatotóxica do veneno de Crotalus terrificus terrificus*

A ação dermatotóxica do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* é muito menos pronunciada do que aquela dos venenos botrópicos. No veneno crotálico,

(*) i.d. = intradermal
(*) i.p. = intraperitoneal

### Tabela VI

*Ação antidermatotóxica do sôro anti-*Bothrops jararaca *No. 17 — dosagem em coelhos (A) — Comparação com o poder anti-"tóxico-geral" do mesmo sôro, dosado em pombos (B)*

*A*

Dosagem na pele abdominal do coelho

| | Sôro antibotrópico | Sol. Veneno *Bothrops jararaca* 1 mg/ml | Na Cl fisiol. | Reação intracutânea depois de | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 2 h | 4 h | 24 h | 48 h | 72 h | 120 h |
| 1. | 0.1 ml | 0.5 ml | 0.15cm³ | E++ | E++ | E+++ | E+++ | I++ N++ | I++ N++ |
| | | | | H+ | H+ | N+ | N++ | | |
| 2. | 0.1 ml | 0.25 ml | 0.4 cm³ | E++ | E++ | E+++ | E+++ | I++ — | I++++ |
| 3. | 0.2 ml | 0.25 ml | 0.3 cm³ | E+ | E+ | E+++ | E++ I+ | — | N± |
| 4. | 0.3 ml | 0.25 ml | 0.2 cm³ | E+ | E+ | I+ | | | I+ |
| 5. | 0.4 ml | 0.25 ml | 0.1 cm³ | E+ | E++ | E+++ I+ | E++ I+ | — | I+ |
| 6. | 0.5 ml | 0.25 ml | — | E+ | E++ | E+++ | O | O | O |
| 7. | — | 0.25 ml | 0.25cm³ | E++ | E++ | E+++ | O | O | O |
| | | | | H+++ | H+++ | E++ | E++ | — | O |
| 8. | — | 0.5 ml | 0.5 cm³ | E++ | E++ | N++ | N++++ | | |
| | | | | H++ | H+ | E++++ | E++++ | — | N+++ |
| 9. | 0.1 ml | — | 0.65cm³ | E± | E± | N+ | N++ | | N++ |
| 10. | 0.5 ml | — | 0.15cm³ | E± | E± | O | O | O | O |
| | | | | | | O | O | O | I± |

*B*

Dosagem em pombos

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1.ª | 0.1 ml | 0.5 ml | 0.15 ml | pombo N.º 37 — pêso 260 g — morto depois de 10' |
| 2.ª | 0.1 ml | 0.25 ml | 0.4 ml | pombo N.º 24 — pêso 250 g — sobrevive 48 h |
| 3.ª | 0.2 ml | 0.25 ml | 0.3 ml | pombo N.º 26 — pêso 260 g — sobrevive 48 h |

Todos os reativos ficaram m contacto por 30' a 37º antes da injeção.

as doses infra-mortais (no coelho) que ficam entre 0.05 e 0. mg produzem somente um fraco efeito sôbre a pele. A única reação que se observa é um ligeiro edema que aparece, em geral, 20 horas após a injeção intradérmica do veneno e que desaparece 24 horas após. Doses mais altas, de 1-2 mg, não mostram efeito algum durante as primeiras horas depois da injeção, além de um ligeiro edema local. Estas doses, porém, matam os animais entre 10-20 horas, tempo insuficiente para o desenvolvimento de nítidas reações locais. Pode ser, aliás, demonstrado, que o veneno crotálico possue, de fato, uma ação dermatotóxica injetando-se na pele do coelho 1-2 mg de veneno (0.2 ml de uma solução a 0.5 — 1.0%) e imediatamente depois o sôro anticrotálico por via venosa, em quantidade suficiente para neutralizar a ação neurotóxica do veneno. Nestas condições, o sôro protege o animal contra a ação geral (neurotóxica) e, sendo incapaz de neutralizar a ação dermatotóxica, a reação cutânea pode manifestar-

TABELA VII

*Ação dermatotóxica do veneno crotálico evidenciada pela injeção simultânea do veneno por via intradérmica e do sôro, por via venosa*

| Coelho N.º | Pêso | Quantidade de veneno injetado intradermicamente | Antiveneno injetado intravenosamente | | Reação depois de | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Sôro N.º | Quantidade | 24 h | 48 h |
| 20 | kg<br>± 1 500 | 1 mg | — | — | morto<br>V± E+ | — |
| 165 | ± 1 500 | 2 mg | — | — | morto<br>V+ | — |
| 115 | ± 1 500 | a) 1 mg<br>b) 2 mg | 173* | 8.5 ml | a) V+ E++<br>b) V++ E++ | N± E++<br>h) N +++ E ++ |
| 167 | 1 200 | a) 1 mg<br>b) 2 mg | 175** | 4 ml | a) N+ E+++ V++<br>b) N+++ E+++ V++ | N++ E++ V++<br>N+++ V++ E+++ |

*Leitura*: E = edema, V = "Vermelhidão" (Eritema), N = necrose.

(*) 1 ml de sôro No. 173 neutraliza 0.8 mg de veneno (dosagem em pombos).

(**) 1 ml de sôro No. 175 neutraliza 1 mg de veneno (dosagem em pombos).

*Nota*: Os animais 115 e 167 receberam as injeções de 1 e 2 mg de veneno em lugares diferentes da pele abdominal ("a" e "b"), guardando-se uma distancia de 8 cm entre os dois lugares injetados.

se nitidamente; depois de 24 horas aparece um forte edema e um eritema de côr vermelho-arroxeado. acompanhado, por vêzes, de hemorragias petequiais. A necrose produzida por 2 mg de veneno é no primeiro dia após a injeção ainda pouco desenvolvida e fica nítida somente depois dum intervalo de mais de 24 horas. O edema persiste sempre até o segundo dia, enquanto que o eritema mostra uma certa tendência a regredir neste intervalo. Uma experiência dêste tipo mostra a Tabela VII.

Quando o veneno (em quantidades de 1-2 mg) é depositado intradermicamente e depois de um intervalo de 5' uma quantidade equivalente do anti-sôro é injetado no mesmo lugar, a única reação a observar é um forte edema e ocasionalmente um ligeiro eritema, ambos aparecendo somente depois de um intervalo de 24 horas. O mesmo efeito é obtido quando sôro e veneno são misturados in vitro e injetados juntamente. depois de ter ficado em contacto à 37° durante 30'. Reações neurotóxicas não são observadas neste caso.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### *Veneno botropico*

O fato de que unicamente as ações hemorragica e necrosante do veneno são neutralizadas pelo sôro enquanto que a ação edemaciante fica praticamente inalterada, mesmo em contacto com doses elevadas do sôro, parece indicar que os dois primeiros fenômenos, *hemorragia* e *necrose,* são devidas a *uma* fração antigênica do veneno, que é diferente de uma segunda fração não antigênica produtora do edema (*).

Podia-se pensar que o efeito edemaciante, não neutralizavel pelo antiveneno, é devido a presença de histamina no proprio veneno ou causado pela libertação secundaria de histamina da pele sob influencia do veneno. Esta ultima hipótese pode ser afastada, porquanto a fração proteolitica e a lecitinase do veneno — que não são geralmente responsaveis pela libertação secundaria de histamina — ficam certamente neutralizadas por quantidades equivalentes do sôro.

As *quantidades de histamina* preexistentes nos venenos são tão *infinitesimais* que tambem não podem ser responsaveis por tal fenomeno.

---

(*) Existe mais um outro argumento que fala em favor da multiplicidade dos fatores dermatotóxicos no veneno botrópico: o aquecimento do veneno a 65° durante meia hora destróe completamente a ação hemorrágica e necrosante do veneno, enquanto que a ação edemaciante fica ainda mais nitida. especialmente com as doses mais altas do veneno. Um aquecimento do veneno ao ponto de fervura, durante 15' diminue muito pouco a ação edemaciante: um edema nitido (E++) é ainda produzido com doses de 30-40 gamas do veneno fervido, efeito comparável ao causado por doses de 10-20 gamas do veneno nativo.

Consignamos os nossos melhores agradecimentos ao nosso colega Dr. Ananias Porto do Instituto Butantan pela dosagem de histamina nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus*, que deram os seguintes resultados:

| Veneno | Dose edemaciante minima D. E. M. | Conteudo em histamina por 1 grama | 1 D. E. M. |
|---|---|---|---|
| *Bothrops jararaca* ......... | 0.02 mg | 0.029 mg | $6 \times 10^{-7}$ mg |
| *Crotalus terrificus terrificus* | 0.05 — 0.1 mg | 0.010 mg | $5 \times 10^{-7}$-$10^{-6}$ mg |

Estes resultados demonstram que a ação edemaciante dos 2 venenos aparentemente não tem relação alguma a histamina e deve ser atribuida, por isso, a uma fração especifica que faz parte integral dos dois venenos.

A atividade anti-hemorrágica — anti-necrosante do sôro antibotrópico se manifesta unicamente quando se injeta uma mistura de veneno + sôro que tenham ficado em contacto, *in vitro*, por algum tempo, ou quando se injeta o veneno dentro de um depósito intradérmico de sôro — 2 tipos de experiência que tem pouco interêsse do ponto de vista prático.

A incapacidade do sôro de neutralizar a ação dermatotóxica do veneno, mesmo quando as duas injeções (do veneno e do sôro) são feitas num curto intervalo de tempo no mesmo lugar, demonstra uma rapidissima fixação do veneno pelas células tissulares; a injeção subsequente de sôro não consegue mais neutralizar o veneno fixado no tecido.

Uma imunização passiva por via intramuscular não exerce efeito sôbre a ação dermatotóxica do veneno, da mesma fórma como a injeção i.v. do sôro imediatamente depois da inoculação intradérmica do veneno; aparentemente a concentração do antiveneno nos tecidos é tão reduzida que não consegue alterar a afinidade do veneno pelo tecido cutâneo.

*Veneno crotalico*

Estas experiências mostram que o veneno crotálico contém, semelhante ao veneno botrópico, duas frações dermatotóxicas 1.) Fração produtora de eritema e necrose neutralizável pelo sôro anticrotálico 2.) Uma fração edemaciante que não é influenciada pelo sôro anticrotálico.

Em relação à termo-resistência, estas frações do veneno crotálico se comportam diferentemente das frações análogas do veneno botrópico. Um aquecimento do veneno a 65° durante 30' destróe o poder necrosante sem afetar niti-

damente o seu poder eritematoso e edemaciante. O aquecimento a 100° durante 5' não modifica muito o resultado; só há uma redução apreciável do eritema e do edema com veneno fervido por 10-20'.

Estes fatos parecem indicar que o aquecimento destróe em função do grau e tempo de aquecimento, gradativamente, o veneno inteiro, não se verificando uma termo-resistência ou labilidade específica das frações descritas.

A dose necrosante mínima do veneno crotálico é cêrca de 10 vêzes maior ( = 2 mg) do que aquele do veneno botrópico (0.2 m), produtora do mesmo efeito; no caso do veneno crotálico, esta dose fica perto da dose letal mínima (para o coelho) e devido a sua ação lenta (24-48 h) não pode ser evidenciada sob condições normais. Uma reação hemorrágico-necrótica se produz unicamente quando o veneno é injetado intradermicamente e o sôro na veia; nestas condições o sôro neutraliza a ação neurotóxica, aparentemente sem atingir no tecido cutâneo uma concentração suficiente para inibir a ação local do veneno.

Contrariamente às observações feitas com o veneno e sôro botrópico, tanto a ação tóxica geral como a ação local do veneno crotálico são neutralizadas (com exceção da ação edemaciante), quando o sôro é injetado num lugar previamente infiltrado com uma dose mortal de veneno (1-2 mg).

Êstes resultados concordam em parte com as observações de Githens que trabalhando com os venenos de crotalídeos norte - e centro-americanos, verificou uma neutralização *in vitro* pelos antivenenos homólogos e heterólogos. "A reação local dos venenos desenvolveu-se tão rapidamente que a injeção subsequente do antiveneno neutralizante não produziu efeito. A toxidez sistemática (geral) era maior com a injeção intradérmica do que com a subcutânea do veneno; nos venenos mais tóxicos a dose letal era menor do que a dermatotóxica." Contrariamente à ação das cascaveis sul-americanas, a maioria das cascaveis norte - e centro-americanas mostraram uma forte ação necrosante nas experiências de Githens.

## RESUMO

O veneno de *Bothrops jararaca* possui uma forte ação dermatotóxica; a injeção intradérmica (em coelhos) de 0.2 — 0.4 mg de veneno causa após poucos minutos o aparecimento de um extenso edema e de hemorragia, seguidos por uma profunda necrose 24-48 horas depois. Doses menores (0.01 — 0.02 mg) causam unicamente um edema das camadas epidermicas superficiais. Demonstramos neste trabalho que o veneno botrópico contém dois princípios dermatotoxicos diferentes: 1.) uma fração produtora do efeito hemorrágico-necrótico, neutralizável in vitro pelo antiveneno específico e destruida pelo aquecimento a

65° durante 30'. 22.) Uma fração edemaciante, não neutralizável mesmo por altas doses do antiveneno, resistente a um aquecimento de 100 graus durante 10' (Experiências em coelhos e cães).

A afinidade das dermatotoxinas para com o tecido cutâneo parece muito grande, visto que a injeção de doses altas de antitoxina não conseguem neutralizar o veneno injetado poucos minutos antes no mesmo lugar. A presença de um anticorpo dirigido contra a ação hemorragico-necrotica pode ser demonstrado pelo fato que u'a mistura do sôro + veneno, injetada após 30' de contacto a 37°, produz unicamente uma reação edematosa.

As atividades antitóxica-geral e antidermatotóxica de um sôro antibotrópico testado em pombos e coelhos, respetivamente, eram aproximadamente iguais.

Em contraste com a rápida e intensa reação dermatotóxica do veneno botrópico, o efeito local do veneno crotálico (de *Crotalus terrificus terrificus*) — no teste em coelhos — não é muito impressionante. Doses baixas (0.05 - 0.1 mg) injetadas intradermicamente produzem depois de algumas horas um edema pouco espalhado o qual desaparece geralmente depois de 24-48 horas. Doses maiores (1-2 mg) matam o animal dentro de 10-20 horas, verificando-se no lugar da injeção unicamente um ligeiro edema e vermelhidão (eritema).

Foi demonstrado, aliás, por um artificio de técnica que também o veneno crotálico possue um fator necrosante: quando se injetam 1-2 mg de veneno crotálico, intradermicamente, e ao mesmo tempo por via venosa uma quantidade de sôro suficiente para neutralizar a ação neurotóxica do veneno, o efeito visível depois de 24-48 horas será uma necrose nítida, cercada de um edema e intenso eritema. Aparentemente o antiveneno introduzido por via venosa não atinge no tecido cutâneo uma concentração suficiente para suprimir a ação necrosante. O sôro anticrotálico, aliás, possui por si mesmo, uma atividade antidermatotóxica, visto que a injeção combinada de sôro + veneno, ou mesmo a injeção sucessiva de veneno e sôro no mesmo local, inibe o desenvolvimento da necrose e do eritema como também o efeito neurotóxico. Como no caso do antiveneno botrópico, o sôro crotálico não contém anticorpo que neutralize a ação edemaciante do veneno (crotálico).

A resistência ao calor das duas frações dermatotóxicas do veneno crotálico difere das frações análogas do veneno botrópico porquanto o aquecimento a 65° por 30' abole unicamente o efeito necrosante do veneno crotálico, sem diminuir a sua atividade eritematosa e edemaciante. Somente quando fervido por mais de 10', o veneno perde gradualmente o poder de produzir os dois últimos sintomas. Êste fato indica uma redução progressiva da atividade do inteiro complexo dermatotóxico em função do tempo e grau de aquecimento. Não existe, no caso do veneno crotálico, uma termolabilidade "especifica" de diferentes frações dermatotóxicas, como foi observado no veneno de *Bothrops jararaca*.

ABSTRACT

The venom of *Bothrops jararaca* has a strong dermatotoxic activity. The intradermal injection (in rabbits) of 0.2 — 0.4 mgr. of the venom produces, after a few minutes, a very extensive edema and hemorrhage, which is followed 24-48 hours later by a deep necrosis. Smaller dosis (0.01 — 0.02 mgr.) cause only an edema of the superficial skin layers. It could be shown in this paper, that the bothropic venom contains two different dermatotoxic fractions, one responsible for the hemorrhagic-necrotizing effect, the other one responsible for the development of an edema.

The hemorrhage-necrosis producing fraction (fraction I) is neutralizable in vitro by specific antiserum and is destroyed by heating to 65° for 30'. The edema producing fraction (fraction II) is not neutralizable even by high dosis of specific antiserum and resists heating to 100° for 10-15' (Experiments in rabbits and dogs). The affinity of the dermatotoxins to the cutaneous tissue appears very strong, since the local injection of high antivenom doses is unable to neutralize the topical action of a venom, which had been injected at the same place a few (3-5) minutes before. The presence of an anti-dermatotoxic (fraction I) antibody can be proved by the fact that the intradermal injection of a serum-venom, mixture which had remained in contact for 30' at 37°, produces only an edematous reaction.

The general antitoxic and the anti-dermototoxic power of an anti-bothropic serum — tested in pigeons and rabbits respectively — were about the same.

Contrary to the intensive dermatotoxic action of the bothropic venom, the local effect of the *Crotalus* venoms (from *Crotalus terrificus terrificus*) in rabbits is not very impressive. The intradermal injection of small venom doses (0.05 - 0.1 mgr.) produces after a few hours a fairly large edema, which generally disappears 24-48 hours later. Higher doses (1-2 mg) kill the animals within 10-20 hours, exposing the injected site slight edema and hyperemia.

By a special technique it can be shown, however, that also the crotalic venom possesses a necrotizing factor:

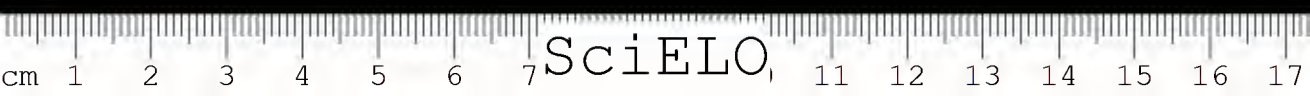
When the intradermal injection of 1-2 mg of crotalic venom is followed immediately afterwards by an antivenom injection of a serum-dose sufficient to neutralize the neurotoxic action, there will appear within 24-48 hour, a marked necrosis, surrounded by an edema and intensive erythema. Appearently, the intravenously injected serum did not attain, in the cuteneous tissue a sufficient concentration to supress necrotizing action. The anticrotalic serum in order possesses an anti-dermatotoxic activity too, since tre combined injection of serum +venom, or even a local serum injection applied 5-10' after the venom injection,

inhibits the development of necrosis and erythema, as well as the neurotoxic effect. As in the case of the antibothropic serum, the edema producing power of the crotalic venom is not interfered with even by high serum amounts.

The heat resistance of the two dermatotoxic fractions (*) of the crotalic venom differs from the homologous bothrops venom fractions in so far as heating to 65° for 30' abolishes only the necrotizing effect of the crotalic venoms without diminishing its edema and erythema producing activity. Only when the venom is boiled for more than 10', it looses gradually its power to cause the last mentioned symptoms. This fact points to a progressive reduction of activity of the entire dermatotoxic venom complex as a function of time and degree of heat applied: there is no specific heat lability of the different dermatotoxic fractions, as in the case of the *Bothrops jararaca* venom.

BIBLIOGRAFIA

*Githens, T. S.* — The polyvalency of Crotalidic antivenins. IV. Antinecrotic, anticoagulant and antiproteolytic actions, *J. Immunol.*, 42:149-159, 1941.

(*) Fraction I — causing erythema and necrosis, neutralizable by antivenom.
Fraction II — causing edema, not neutralizable by antivenom.

# O FATOR DE DIFUSÃO ("SPREADING FACTOR") DOS VENENOS DE *BOTHROPS JARARACA* E DE *CROTALUS TERRIFICUS TERRIFICUS*

POR F. W. EICHBAUM (*)

*(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

A injeção intradérmica de extratos testiculares aumenta intensamente a permeabilidade do tecido cutâneo, o que se manifesta pela rápida difusão de uma suspensão de tinta Nankin injetada no mesmo lugar (2, 3, 11, 12).

O poder de aumentar a difusão é atribuido a um fator especifico ("spreading factor") contido nos extratos testiculares; uma certa avaliação quantitativa obtem-se medindo a área de infiltração preta produzida pela injeção simultânea do extrato + tinta Nankin, em comparação com a área preta produzida pela injeção de tinta Nankin em água fisiológica.

Um fator semelhante àquêle presente nos testiculos foi encontrado mais tarde por Duran-Reynals e outros, em extratos bacterianos (estafilococos, pneumococos. bacilos de gangrena gasosa), em tumores malignos, nos venenos de espécies ofidicas norte-americanas e australianas como também em outros animais venenosos (aranhas, escorpiões, sanguesugas (4, 9, 10, 13, 14).

De acôrdo com os trabalhos de Duran-Reynals, o spreading factor "de venenos ofídicos sofre pouco pelo aquecimento à 65-100°, temperatura suficiente para destruir a ação tóxica geral do veneno da rattlesnake"; ao contrário, Madinaveitia (9) achou o "spreading factor" (mucinase) do veneno de *Crotalus atrox* mais termo-sensível do que os componentes neurotóxicos (protease, lecitinase).

Duran-Reynals mostrou ainda que os soros antiofídicos são capazes de neutralizar especificamente a ação tóxica local da spreading factor dos venenos.

A presença de fatores de difusão em orgãos, tecidos, líquidos de composição e proveniência tão diferente, constituiu um fenômeno problemático, até que Chain e Duthie (1) conseguiram demonstrar que o extrato testicular possui uma forte ação mucolitica; ésta atividade pode ser demonstrada pela queda rápida da viscosidade, que sofrem certas mucoproteinas (do corpo vítreo do olho, do cordão umbilical) em presença de extratos testiculares.

(*) Estagiario.

Entregue para publicação em 13 de fevereiro de 1947.

Esta observação sugeriu a probabilidade de que o spreading factor fosse nada mais do que uma mucinase — mais exatamente uma hyaluronidase — que agia sôbre as substâncias mucoides intrafibrilares do colagêno da cutis (13,14). Ésta hipótese foi ainda melhor apoiada pelas observações subsequentes de vários autores que verificaram que todos os produtos portadores de uma hyaluronidase provocam também o fenômeno do "spreading"; por outro lado Meyer e Chaffee (15, 16, 17) afirmam que nem tôdas substâncias causadoras de "spreading", contêm necessariamente uma hyaluronidase. Contra ésta observação fica o pêso da evidência de muitos outros autores que demonstraram uma coincidência constante do fator de difusão e da mucinase.

Faltam até agora suficientes experiências quantitativas para realmente provar a indentidade do "spreading factor" e da hyaluronidase.

A presença de um fator de difusão nos venenos ofídicos de *Vipera aspis*, *Lachesis alternatus* e *lanceolatus* (= *Bothrops jararaca*). *Crotalus terrificus Naje haje* foi demonstrada por Tarabini-Castellani (19) em 1938: Favilli (5) verificou que os mesmos venenos possuem um enzima de alto poder mucolítico que é neutralizado pelos antivenenos específicos; o aquecimento do veneno a 70° durante 30' aboliu inteiramente o seu poder mucolítico. Também o veneno da *Vipera russellii* possui um fator que reduz a viscosidade de acido hialuronico; pela digestão enzimática do muco libertam-se substâncias redutoras, como N-acetyl hexosamina, cuja quantidade é em certa relação quantitativa ao decrescimo da viscosidade (14) (*).

Madinaveitia (9) purificou a mucinase da *Crotalus atrox* por adsorção à terra de Fuller.

A importância prática do "spreading factor" reside no fato que êste princípio parece intimamente ligado à facilidade com que certos germes piogênicos se implantam no tecido impregnado por tal fator. É de fato conhecido o grande perigo da infecção local das feridas causadas pela mordida de serpentes venenosas.

O presente estudo trata da presença do "spreading factor" nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* e sua neutralização pelos sôros específicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

No estudo do "spreading factor" na pele depilada de coelhos encontramos certas dificuldades de ordem técnica que conseguimos eliminar sómente depois de repetidas experiências em numerosos animais. Além da dificuldade de depositar quantidades iguais do veneno sôro, etc., na mesma altura da epiderme,

---

(*) Também outras substâncias redutoras como o ácido ascórbico, phenylhydrazina, etc. produzem uma diminuição da viscosidade do muco.

os coelhos demonstraram uma reatividade individual bem variável tanto em relação ao sôro como aos venenos ou a mistura dos dois. Para excluir o mais possível êste fator individual injetamos no lado direito do abdomen os contrôles (tinta Nankin em salina, sôro antiofídico + tinta Nankin; sôro normal + tinta Nankin) e no lado esquerdo os respectivos reativos junto com o veneno.

O lugar da injeção (perto do processo xifoide ou da sínfise) parece pouco influenciar o tipo da reação. Por outro lado a leitura dos resultados fica em certos casos dificultada numa observação prolongada (2-3 horas) pela confluência das zonas de "spreading", impossibilitando desta maneira uma demarcação exata das lesões. Em tais casos repetimos a experiência num maior número de coelhos, nos quais foram aplicadas só 4 injeções por animal (2 para o teste, 2 para contrôle). No estudo do spreading factor é imprescindível escolher animais aproximadamente do mesmo pêso e idade. Os animais com um pêso acima de 2500 gramas apresentam geralmente uma pele rígida, grossa em que o fenômeno do "spreading" se desenvolve pouco nitidamente.

Preferimos para êste estudo, em geral, coelhos (brancos) com um pêso médio de 1200 — 1500 gramas, cuja pele fina é um indicador sensível ao "spreading factor". Uma avaliação quantitativa do grau do "spreading" fizemos medindo o diâmetro maximo da zona corada pela tinta Nankin.

Um fator que dificultou ainda o estudo da ação "anti-spreading" dos antivenenos, foi a propriedade de certos sôros causarem por si só (sem presença do veneno) um nítido "spreading" em comparação com o contrôle. Encontramos êste fenômeno principalmente com os soros anticrotálicos (tanto nativos como concentrados pelo sulfato de amônio). Em tais casos, naturalmente não se pode concluir sôbre uma eventual neutralização do veneno.

A maior frequência do spreading espontâneo dos sôros anticrotálicos (observado ocasionalmente também com os sôros anti-botrópicos) pode se explicar, em parte, pelo fato que a quantidade relativa do sôro injetado era maior nos soros crotálicos devido ao seu menor titulo de neutralização. (outros pormenores da técnica podem ser vistos nas tabelas I e II).

Nos seguintes gráficos (I, IIa e IIb) estão condensados os resultados de várias experiências realizadas num total de 46 animais e com 4 sôros antibotropicos, 4 soros anticrotalicos e 8 soros normais de cavalo.

## RESULTADOS

### *Gráfico I*

"Spreading factor" do veneno de *Bothrops jararaca* e sua neutralização pelo antiveneno específico. As abscissas dão o tempo de observação em minutos, as ordenadas o diâmetro máximo do spreading em cm.

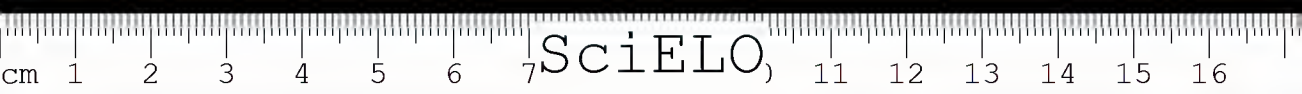
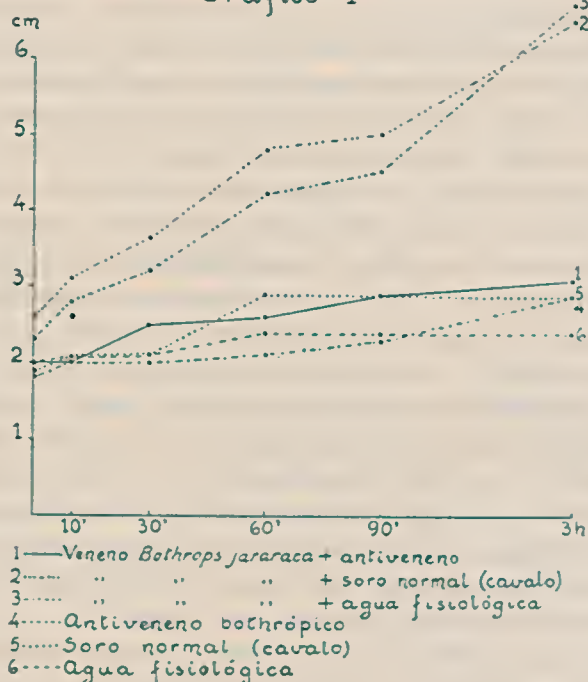



TABELA I

(*mostrando a proporção dos vários reativos misturados* in vitro)

| S | Tubos n.° | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Tinta Nankin 1/10 .. | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml |
| Sol. veneno jararaca 10 mg/ml ........ | 0.1 ml | 0.1 ml | 0.1 ml | — | — | — |
| Sôro antibotrópico (**) | 0.5 ml | — | — | 0.5 ml | — | — |
| Sôro normal de cavalo (*) ......... | — | 0.5 ml | — | — | 0.5 ml | — |
| NaCl fisiológico .... | — | — | 0.5 ml | 0.1 ml | 0.1 ml | 0.6 ml |

(*) Os sôros normais de cavalo nunca mostraram uma tendência a um "spreading" espontâneo, mesmo quando usados em dóses elevadas. As pequenas quantidades de fenol, contidas nos antivenenos ofídicos, não influem sôbre o "spreading" como conseguimos verificar em contrôles realizados neste sentido.

(**) 4 diferentes sôros nativos e concentrados pelo sulfato de amônio que se comportaram praticamente de modo idêntico. O título antitóxico dos 4 sôros testados em pombos variava de 1,9 mg a 2,4 mg de veneno neutralizado por 1 ml de sôro.

De cada mistura, dos tubos 1-6. injetam-se 0.2 ml intradermicamente na pele abdominal do coelho. A quantidade do sôro antibotrópico usado corresponde àquela que na dosagem em pombos neutraliza 1 mg, ou seja a quantidade de veneno injetado nesta experiência.

*Conclusão*: 1) O veneno de *Bothrops jararaca*, injetado intradermicamente no coelho em quantidades de 0.2 mg (contido num volume de 0.2 mgl) mostra nitidamente a presença de um "spreading factor". Êste fator é quase completamente neutralizado em presença de quantidades equivalentes (*) do antiveneno específico. Também o sôro anticrotálico parece exercer uma certa inibição, que aliás - mais fraca do que a causada pelo sôro botrópico (**). O sôro normal de cavalo reforça nitidamente o "spreading" causado pelo veneno. Vários sôros normais testados sempre deram ausência de um "spreading factor", enquanto que alguns dos sôros anti-*Bothrops jararaca* também em ausência de veneno promoveram a difusão da tinta Nankin na epiderme do coelho; tais sôros não podiam ser usados no estudo da neutralização do "spreading factor" dos venenos.

## B. *Veneno crotálico*

TABELA II

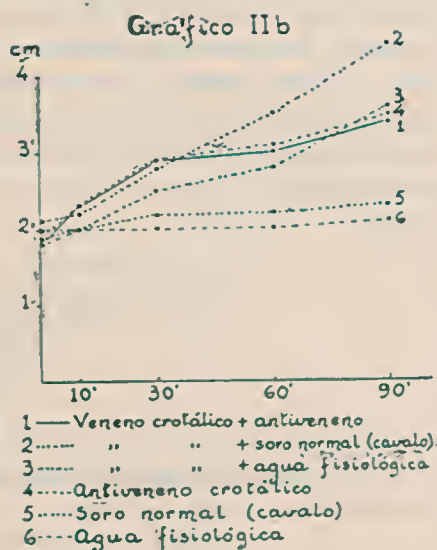
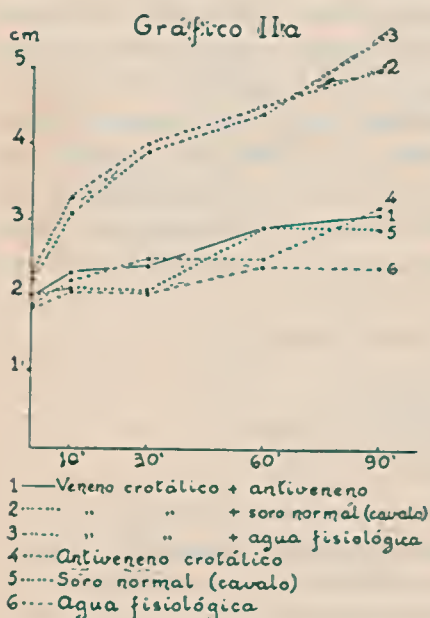
(*mostrando a proporção dos vários reativos misturados* in vitro)

| | Tubos n.º | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Tinta Nankin 1/10 .. | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml |
| Sol. veneno *C. t. terrificus* 5 mg ml . | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml | — | — | — |
| Sôro anticrotálico (1 ml neutraliza 0.8 1 mg veneno) .... | 1.3 ml | — | — | 1.3 ml | — | — |
| Sôro normal de cavalo | — | 1.3 ml | — | — | 1.3 ml | — |
| Na Cl. fisiol. ...... | — | — | 1.3 ml | 0.2 ml | 0.2 ml | 1.5 ml |

(*) De acôrdo com o poder antitóxico geral testado em pombos. Experiências quantitativas no sentido de determinar a dóse mínima do sôro, capazes de inibir o "spreading", não foram feitas.

(**) Devido ao número relativamente pequeno de observações êstes resultados não foram registrados no gráfico I.

Gráfico IIa e IIb

"Spreading factor" do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* e sua neutralização pelo antiveneno específico. As abscissas dão o tempo de observação em minutos, as ordenadas o diâmetro máximo em cm.

De cada mistura dos tubos 1-6 injetam-se 0.2 ml intradermicamente na pele abdominal do coelho. A quantidade de sôro anticrotálico usada corresponde àquela que na dosagem em pombos neutraliza 1 mg, ou seja, a quantidade de veneno usada nesta experiência. Devido ao baixo podtr neutralizante destes sôros, comparados com os sôros antibotrópicos, a quantidade absoluta do sôro nestas experiências é maior do que nas experiências com veneno e sôro botrópico.

Os resultados obtidos foram divididos em 2 grupos; incluímos no gráfico IIa aquelas experiências em que os sôros crotálicos não possuiram fator intrínsico capaz de promover a difusão da tinta Nankin, permitindo desta maneira observar o seu poder neutralizante sôbre o "spreading factor" do veneno; incluiram-se ainda os sôros de cavalo que aumentaram só fracamente o "spreading" causado pelo veneno. No gráfico IIb registramos as experiências com soros anticrotálicos, que possuiram por si mesmos um fator de difusão e os sôros nor-

mais que promoveram fortemente o "spreading", quando combinados com o veneno crotálico. O conteúdo dos sôros anticrotálicos e normais (de cavalo) em fenol na quantidade de 0.2 — 0.4% não influe sôbre o caráter do "spreading", como conseguimos verificar em experiências de contrôle.

*Conclusão*: O veneno de *Crotalus terrificus terrificus* possui um "spreading" factor neutralizavel pelo anti-sôro específico (gráfico IIa). Alguns dos sôros anticrotálicos possuem um poder intrínseco de aumentar a difusão da tinta Nankin (gráfico IIb), desconhecendo-se os fatores que determinam esta qualidade peculiar a alguns sôros. O sôro normal de cavalo, por sí só incapaz de promover a difusão da tinta Nankin reforça o "spreading" causado pelo veneno crotálico; o valor ativador de sôros normais sôbre o "spreading factor" do veneno crotálico varia de sôro para sôro (fraca ativação: gráfico IIa; forte ativação: gráfico IIb). Apesar de algumas observações indicarem uma fraca ação inibidora do sôro antibotrópico sôbre o "spreading factor" do veneno crotálico, não incluimos estas experiências nos gráficos acima, devido à escassez de observações detalhadas.

Interessava ainda saber si os venenos botrópicos e crotálicos, portadores do "spreading factor" possuem também uma atividade mucolítica. Por falta de aparelhagem adequada, fizemos um test de orientação, no qual medimos o tempo de esvaziamento de uma pipeta de bola com uma capacidade de 18 cm³. Comparamos o tempo de esvaziamento da mistura muco (corpo vítreo de olho de boi) + veneno + buffer (*), depois de vários períodos de incubação à 37.º, com o tempo de esvaziamento de muco + buffer e de água + buffer.

Verificou-se em numerosos experiências paralelas, uma diminuição progressiva da viscosidade em tôdas as misturas muco + veneno, atingindo valores pouco acima do valor de água; contrariamente a mistura muco + buffer conservou uma viscosidade constante durante todo o tempo de observação.

Conclue-se disso que tanto o veneno de *Bothrops jararaca* como de *Crotalus terrificus terrificus*, portadores de um "spreading factor", possuem também uma mucinase capaz de reduzir a viscosidade de substratos ricos em ácido hyalurônico (corpo vítreo de olho de boi).

---

(*) buffer acetato pH 4.8 o que corresponde aproximadamente ao optimum da atividade da hyaluronidase.

TABELA III

*Diminuição da viscosidade do corpo vítreo de ôlho de boi em presença de venenos botrópico e crotálico*

| Contacto dos reat. à 37° | 1) Corpo vitreo 17.0ml; Ven. jararaca 20 mg/cm³ 1.0ml; buffer ...... 2.0ml | 2) Corpo vitreo 17.0ml; Ven. crotálico 20 mg/cm³ 1.0ml; buffer ...... 2.0ml | 3) Corpo vitreo 17.0ml; sol. fisiol. .. 1.0ml; buffer ..... 2.0ml | 4) Agua dist. ... 17.0; sol. fisiol. .... 1.0; buffer acet. pH 4.8 ........ 2.0 |
|---|---|---|---|---|
| 0 ... | 36½" | 37 " | 37 " | 29" |
| 1 h . | 31 " | 31 " | 38 " | 29" |
| 2 h . | 30½" | 31 " | 37 " | 29" |
| 3 h . | 31 " | 30½" | 37½" | 30" |

Os segundos indicam o tempo de esvasiamento de uma pipeta graduada de 18 cm3 volume.

## DISCUSSÃO

Confirmam-se os resultados obtidos por Tarabini-Castellani (1938) sôbre a presença de fatores de difusão nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus*.

Nossa observação de que a atividade do "spreading factor" dos venenos botrópico e crotálico é nitidamente reforçada em presença do sôro normal parece interessante por que uma ativação pelo sôro pode ser observada também em outras frações dos venenos:

1 Ativação do poder hemolítico em presença de sôro; este fenômeno pode ser explicado pelo desdobramento da lecitina do sôro com a formação de lisolecitina, não podendo-se excluir a possível colaboração de outros fatores ativantes do sôro.

2 Ativação do poder metahemoglobinisante do veneno de *B. jararaca* e de outros venenos botrópicos (observação não publicada do autor).

Não temos conhecimentos exatos de que maneira o sôro ativa o "spreading factor", podendo-se admitir a formação de um produto secundário ativo, libertado do sôro sob a influência do veneno.

A verificada diminuição da viscosidade de ácido hyalurônico (impuro) em contato com os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* confirma os resultados obtidos por Favilli (5) demonstrando a coincidência, si

não a identidade, dos "diffusing factors" e da mucinase (hyaluronidase). De acôrdo com os recentes trabalhos de Humphrey (7,8) parece mais certo de admitir a existência de diferentes hyaluronidases nos vários venenos e toxinas o que explicaria a especificidade dos antisôros capazes de suprimir o "spreading" causado por certa substância (venenos, extratos de orgãos etc).

Analizando os princípios responsáveis pela atividade do "spreading" dos venenos ofídicos, é preciso tomar em consideração também a capacidade dos venenos de libertarem histamina, a qual por sua vez promove a migração de partículas coloidais no tecido cutâneo (18).

## RESUMO

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* possuem um fator de difusão ("spreading factor") neutralizável pelos respectivos antisôros específicos, mostrando-se ainda uma neutralização incompleta pelos sôros heterólogos.

A atividade do "spreading factor" é intensamente reforçada pela mistura dos venenos com sôro normal de cavalo; tais soros possuem por si só nenhuma atividade de "spreading". Entre os antivenenos botrópicos e crotálicos (ambos preparados em cavalos), encontraram-se alguns que possuiram um poder intrinseco de causarem o fenômeno de "spreading".

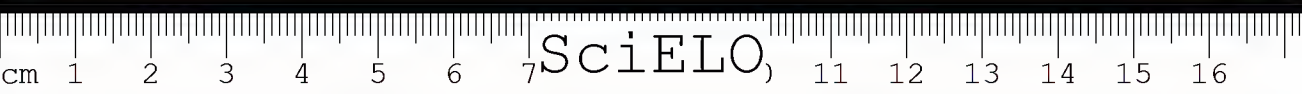
A ativação do "spreading factor" dos venenos pelo sôro normal têm uma certa analogia na ativação pelo sôro, observada em outras frações de venenos: ativação da hemólise, ativação do poder metahemoglobinisante (transformação da hemoglobina em metahemoglobina) (*).

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* possuem uma mucinase capaz de reduzir a viscosidade de ácido hyalurônico (corpo vítreo do olho de boi).

Analisando os princípios responsáveis pelo fenômeno do "spreading" causado pelos venenos ofídicos, é preciso considerar também a capacidade dos venenos de libertarem histamina, a qual por sua vez promove a migração de partículas coloidais no tecido cutâneo.

## ABSTRACT

The venoms of *Bothrops jararaca* and *Crotalus terrificus terrificus* are carriers of a spreading factor which is completely neutralized by the homologous antivenoms and partially by the heterologous antivenom.

(*) Observações do autor não publicadas.

The intensity of spreading caused by either venom is strongly activated in presence of normal horse serum, which had stayed in contact with the venom during 1/2 hour at 37.°. Normal horse serum by itself does not increase the spreading of Indian ink, on intracutaneous injection. The activation of the spreading factor by normal sera has a certain analogy in the serum-activation of other toxic principles of some venoms: the activation of hemolysis, the activation of an oxydizing enzàme which transforms hemoglobin in to methemoglobin.

In some instances antibothropic and anticrotalic sera, both prepared in horses, were found to contain an intrinsic spreading promoting principle.

Bothropic as well as crotalic venoms reduce the viscosity of vitreous humour preparations (mucinase activity).

In appreciating the spreading activity of snake venoms and the supposed identity of the spreading factor and hyaluronidase, the histamin liberating power of these venoms should also be taken into account, since histamin by itself is known to promote the migration of colloidal particles in the dermal tissue.

BIBLIOGRAFIA

1. *Chain, E. & Duthie, E. S.* — Mucolytic enzyme in testis extracts, *Nature*, **144**:977-978, 1939.

2. *Duran-Reynals, F.* — Studies on a certain spreading factor existing in bacterial and its significance for bacterial invasiveness, *J. Exper. Med.*, **58**:161-181, 1933.

3. *Duran-Reynals, F.* — Further studies on influence of testicle extract upon effect of toxins bacteria and viruses and on Shwartzman and Arthur's phenomenon, *J. Exper. Med.*, **58**:451-463, 1933.

4. *Duran-Reynals, F.* — Spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action, *J. Exper. Med.*, **69**:69-81, 1939.

5. *Favilli, G.* — Mucolytic efect of several diffusing agents and diazotized compound, *Nature*, **145**:866-867, 1940.

6. *Hoffman, D. C. & Duran-Reynals, F.* — Influence of testicle extract on intradermal spread of injected fluids and particles, *J. Exper. Med.*, **53**:387-398, 1931.

7. *Humphrey, J. H.* — Studies on diffusing factors. I. The kinetic of the action of hyaluronidase from various sources upon hyaluronic acid, with a note upon anomalies encountered on the estimation of N.-acetyl glucosamine, *Bioch. J.*, **40**:435-441, 1946.

8. *Humphrey, J. H.* — Studies on diffusing factors. II. The action of hyaluronidase preparations from various sources upon some substrates other than hyaluronic acid, *Bioch. J.*, **40**:442-445, 1946.

9. *Madinaveitia, J.* — Diffusing factors; concentration of mucinase from testicular extracts and from *Crotalus atrox* venom, *Bioch. J.*, **35**:447-455, 1941.

10. *Madinaveitia, J. & Quibell, T. H. H.* — Diffusing factors; effect of salts on action of testicular extracts on viscosity of vitreous humour preparations, *Bioch. J.*, **35**:456-460, 1941.

11. *McClean, D.* — Influence of testicular extract on dermal permeability and response to vaccine virus, *J. Path. & Bact.*, 33:1045-1070, 1930.

12. *McClean, D.* — Further observations on testicular extract and its effect upon tissue permeability, *J. Path. & Bact.*, 34:459-470, 1931.

13. *McClean, D.* — Factor in culture filtrates of certain pathogenic bacteria which increases permeability of tissues, *J. Path. & Bact.*, 42:477-512, 1936.

14. *McClean, D. & Hale, C. W.* — Studies on diffusing factors; hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability, *Bioch. J.*, 35:159-183, 1941.

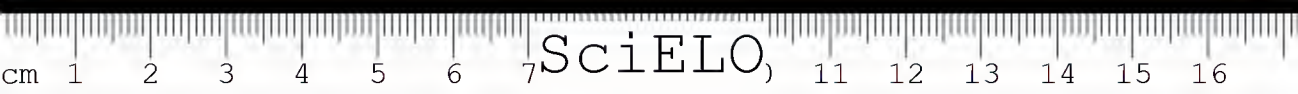
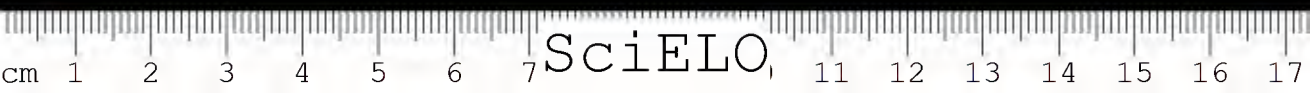
15. *Meyer, K. & Chaffee, E.* — Mucopolysaccharide acid of pleura and possible relation to spreading factor, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 43:487-489, 1940.

16. *Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffee, E. & Dawson, M. H.* — Hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes, *J. Exper. Med.*, 71:137-146, 1940.

17. *Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffee, E. & Dawson, M. H.* — Relationship between "spreading factor" and hyaluronidase, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 44:294-296, 1940.

18. *Rocha e Silva, M.* — Histamina e Anafilaxia, S. Paulo, Gráfica e Editora Edigraf Ltda., 1946.

19. *Tarabini-Castellani, G.* — Sulla presença di "Fattori" di diffusione in alcunti veleni animali, *Arc. Ital. Med. Sper.*, 2:969-978, 1938.

Mem. Inst. Butantan.
20:107-112, Dez.° 1947.



# TRANSMISSÃO DO VIRUS DA FEBRE MACULOSA MEXICANA POR *AMBLYOMMA STRIATUM* KOCH, 1844 (*)

POR A. VALLEJO-FREIRE

(*Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil*)

Em 1943, Bustamante e Varela (1,2) isolaram de doentes de febre maculosa, no México, um virus, cujo comportamento experimental nos animais de laboratório tivemos oportunidade de estudar em publicação anterior (3). Os referidos autores examinaram inúmeros ixodidas capturados nos principais focos da doença, situados nos Estados de Sinaloa e Sonora, com o fim de encontrar exemplares naturalmente infetados, que pudessem ser responsabilizados como vetores desta riquetsiose (4).

As pesquisas feitas em vários lotes de ixodidas, num total de 2.190 exemplares, pertencentes ás espécies *Argas persicus* (Oken, 1918), *Boophilus annulatus* (Say, 1821) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), não permitiram concluir serem estas espécies de ixodidas responsáveis pela transmissão da febre maculosa no México.

Posteriormente, Mariotte, Bustamante e Varela (5) encontraram sôbre um cão exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* naturalmente infetados.

Dos estudos feitos por diversos autores sôbre os vetores da febre maculosa no Brasil pode se concluir da facilidade com que os ixodidas do gênero *Amblyomma* se infetam e transmitem a infecção.

Salles Gomes (6) no homem e, posteriormente, Travassos (7) no cão encontraram *Amblyomma striatum* Koch, 1844, naturalmente infetado com o virus da febre maculosa em São Paulo. Este último autor (8,9) mostrou também ser possível a transmissão experimental da febre maculosa em São Paulo pelo *Amblyomma striatum*.

Neste trabalho estudamos a possibilidade de *Amblyomma striatum* se infetar com o virus mexicano e transmitir a infecção por picada.

---

(*) Com. à Soc. Biol. S. Paulo, em fevereiro de 1945.

Entregue para publicação em 14 de abril de 1947.

## MATERIAL E METODOS

Os exemplares de *Amblyomma striatum* foram capturados sôbre cães da Fazenda do Instituto Butantan, na fase adulta, sexuada. Nesse local, apesar de repetidas pesquisas, nunca foram encontrados carrapatos infetados. Para maior segurança, com alguns exemplares dos lotes colhidos foram feitas as provas rotineiras usadas para afastar a hipótese de eventual infecção natural.

Os ixodidas escolhidos foram colocados sôbre cobaias infetadas, para que se alimentassem durante o periodo de circulação do virus. Retirados antes de estarem totalmente alimentados foram mantidos á temperatura ambiente do laboratório e depois de alguns dias colocados sôbre cobaias normais, afim de se tentar a transmissão da infecção por picada.

*Virus BV.* Originário do México, isolado de um doente de infecção exantemática por Bustamante e Varela. Recebido em *Ornithodoros* sp. e mantido por passagens sucessivas em cobaias.

## RESULTADOS

*1a. Experiência.* 12 *Amblyomma striatum* normais, adultos, machos, depois de mantidos 20 dias á temperatura ambiente no laboratório, foram colocados sôbre uma cobaia infetada durante o periodo correspondente à circulação do virus no sangue. Decorridas 24 horas, encontramos 8 ixodidas alimentados, mas ainda fixos á pele da cobaia; os 4 restantes foram desprezados.

Três dias depois, 4 ixodidas foram separadamente triturados e o material obtido, suspenso em salina esteril. Inocularam-se quatro cobaias, cada qual com a suspensão correspondente a um ixodida. Três cobaias reagiram após periodo de incubação algo prolongado; duas morreram da infecção, uma no 10.º e outra no 11.º dia da inoculação; outra cobaia mostrou reação benigna, depois de 7 dias de incubação, sobrevivendo. Esta, quando reinoculada com virus *BV* de passagem, apresentou sólida imunidade. A quarta cobaia, que não apresentou reação térmica, também se mostrou protegida, quando inoculada com virus de passagem 16 dias depois de receber pela via subcutânea a suspensão do ixodida.

Decorridos 15 dias da alimentação infetante, verificou-se que, um exemplar dos quatro restantes estava morto. Cada qual dos 3 ixodidas vivos, foi triturado separadamente e o conteúdo de suas viceras, livres de carapaça, suspenso em 2 cm³ de salina esteril. Com a suspensão de cada carrapato inoculamos duas

cobaias pela via subcutânea, 1 cm³ em cada cobaia. Como resultados destas provas verificou-se que dois dos ixodidas mantiveram ativo o virus *BV*, pois as cobaias inoculadas reagiram tipicamente. As cobais inoculadas com material do terceiro carrapato não apresentaram infecção clínica característica, nem lesões correspondentes à invasão das riquetsias da F. Maculosa Mexicana.

*2a. Experiência.* Três exemplares machos de *Amblyomma striatum* (A, B e C) foram depositados sôbre uma cobaia (No. 24.085) inoculada com virus *BV* (6.ª passagem). Vinte horas depois, foram êles encontrados fixos á pele do animal, parcialmente alimentados; retirados, foram guardados durante 6 dias em tubos próprios para conservação de ixodidas e mantidos em estufa á temperatura de 26°C.

Um dos exemplares (A), depois de lavado externamente com solução fisiológica, foi triturado. O conteúdo de seus orgãos internos, isento das partes quitinosas suspenso em 2 cm³ de salina e inoculado pela via subcutânea em duas cobaias, cada qual com 1 cm³.

Só uma cobaia reagiu tipicamente, morreu da infecção e apresentou á necropsia as lesões caracteristicas originais, provocadas pelo virus *BV*. Nesta cobaia foi possivel evidênciar a presença de riquetsias no protoplasma das células do exsudato peritoneal. Com sangue e tecido cerebral transmitimos a infecção a outras cobaias e o virus foi a seguir mantido em série.

Os dois *Amblyomma striatum* restantes (B e C), após o 7.° dia da última alimentação parcial, completaram a alimentação em cobaias normais (Nos. 24.177 e 24.178) durante 48 horas. Deste modo, ao mesmo tempo que estimulavamos a multiplicação das riquetsias eventualmente introduzidas nos ixodidas durante a primeira alimentação, aproveitamos as cobaias para demonstrar a transmissão pela picada de *Amblyomma striatum*.

Um dos ixodidas (B), decorridas 24 horas depois de colocado sôbre a cobaia No. 24.177, não estava fixado á pele do animal, mas sim após 48 horas, por ocasião da retirada, não tendo, no entanto, sugado a cobaia, pois o contrôle de pêso antes e depois da colocação do ixodida não acusou aumento.

O outro ixodida (C), colocado sôbre a cobaia No. 24.178, pelo contrário, estava fixo depois de 24 e 48 horas, sendo evidente o aumento de volume devido á sucção de sangue.

A cobaia No. 24.177 foi observada durante 10 dias depois de retirado o carrapato, não mostrando qualquer alteração térmica, nem mesmo á necropsia foi possível encontrar quaisquer alterações nos orgãos internos.

A Cobaia No. 24.178 ao terceiro dia apresentou reação térmica intensa (40°7), tendo-se mantido elevada a temperatura durante mais 5 dias, morrendo da infecção no 6.° dia e apresentando lesões típicas da infecção. Esta cobaia foi sangrada no 1.° dia de elevação térmica e o sangue obtido foi injetado pela via peritoneal em duas cobaias; uma delas reagiu mais ou menos tipicamente e ao ser sacrificada no 9.° dia apresentou lesões caracteristicas. As passagens feitas com sangue colhido no 8.° dia resultaram negativas, talvez porque o material não tenha sido colhido em momento propício. Por este motivo a infecção não foi mantida em série.

Os dois carrapatos, B e C, decorridas 24 horas foram triturados de mistura com 4 $cm^3$ de solução fisiológica. A emulsão obtida serviu para inocular duas cobaias (Nos. 24.281 e 24.282) pela via subcutânea. Em ambas se evidenciou a presença de virus, pois sofreram infecção tipica. A cobaia No. 24.282 no 8.° dia após a inoculação ou 5.° da temperatura elevada, foi sangrada e sacrificada. Tanto com o sangue, como com o cérebro deste animal de prova foram obtidas séries positivas de passagens de virus de cobaia a cobaia, conservando as propriedades primitivas do virus.

*3a. Experiência.* Uma outra experiência de transmissão foi feita com uma fêmea de *Amblyomma striatum*, colocada a sugar cobaia infetada com o virus *BV* no periodo da circulação do virus e retirada 24 horas depois, quando parcialmente alimentada. Seis dias depois de permanecer a 35°C, esta fêmea foi colocada sôbre cobaia normal durante 4 dias, sendo retirada engorgitada. A cobaia utilizada não apresentou febre maculosa, nem mesmo inaparente.

A seguir a fêmea cheia de sangue foi mantida à temperatura ambiente do laboratório (cerca de 22°C), iniciando a desova 20 dias depois. Os ovos postos nas primeiras 48 horas, em número aproximadamente de 150, foram lavados repetidas vezes, triturados de mistura com 3 $cm^3$ de solução fisiológica. O material obtido foi inoculado em duas cobaias, recebendo cada animal pela via subcutânea 1.5 $cm^3$ da emulsão. Estas cobaias não se infetaram e, quando reinoculadas com virus de passagem, não se mostraram protegidas.

Decorridos mais 6 dias, com os ovos resultantes da postura feita nos 6 dias anteriores, repetimos a experiência, inoculando duas cobaias pela via subcutânea com o resultado da trituração de mistura com salina. Ambas reagiram tipicamente, inclusive com reação escrotal intensa. Uma morreu da infecção; a outra foi sangrada no 7.° dia, quando em plena reação febril, e o sangue obtido, inoculado em duas novas cobaias. Sacrificadas logo depois, retiramos o

cérebro e com êle preparamos u'a emulsão, que após ligeira centrifugação foi utilizada para inocular duas cobaias.

Tanto as cobaias inoculadas com sangue, como com cérebro, se infetaram e reagiram tipicamente, fornecendo passagens positivas em série. Em uma delas foi possível evidenciar a presença de riquetsias no exame feito no exsudato peritoneal.

O ixodida fêmeo utilisado nestas experiências morreu 6 dias mais tarde, isto é, 44 dias depois da alimentação infetante. Vinte e quatro horas após a morte foi triturado e o material resultante inoculado em duas cobaias. Estas não apresentaram reação típica de febre maculosa, porém, quando reinoculadas 15 dias depois, mostraram proteção para o virus homólogo. Isto permite concluir que as riquetsias mortas aí existentes ainda foram antigenicamente capazes de provocar imunidade.

RESUMO

*Amblyomma striatum* se infecta ao se alimentar em cobaia infetada pelo virus da riquetsiose mexicana em estudo e pode transmitir por picada a infecção.

Fêmeas de *Amblyomma striatum*, alimentadas em cobaia infetada, dão postura a ovos, que a partir do terceiro dia da desova podem fornecer emulsões infetantes.

ABSTRACT

*Amblyomma striatum* is infected experimentally when feeding on guinea-pig infected with the Mexican spotted fever virus and transmits the infection by bite.

Female specimens of *Amblyomma striatum*, fed on infected guinea-pig, give posture to eggs, which render infectious emulsions from the third day of posture on.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Una nueva rickettsiosis en Mexico. Existencia de la fiebre manchada americana en los Estados de Sinaloa y Sonora. *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, **4**:189-210, 1943.

2. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Aislamiento de una cepa de fiebre manchada identica a la de las Montañas Rocosas en Sinaloa, Mexico. *Bol. Of. San. Pan.*, **23**: 117-118, 1944.

3. *Vallejo-Freire, A.* — Spotted fever in Mexico. Immunological relationship between the virus of the rickettsiosis observed in Sonora and Sinaloa, Mexico, and other Spotted Fever viruses. *Mem. Inst. Butantan,* **19**:159-180, 1946.

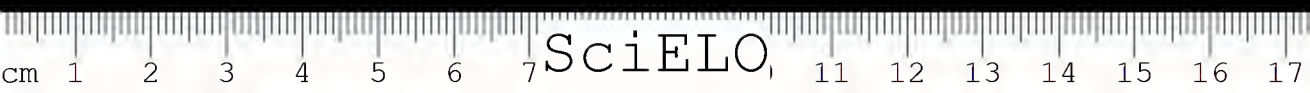
4. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Caracteristicas de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora y Sinaloa, Mexico. *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.,* **5**:129-1936, 1944.

5. *Mariotte, C. E., Bustamante, M. E. & Varela, G.* — Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (Mexico). *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.,* **5**:297-300, 1944.

6. *Gomes, L. Salles.* — Typho exanthematico de São Paulo. *Brasil-Medico,* **47**:923-926, 1933.

7. *Travassos, J.* — La tique *Amblyomma striatum* Koch, 1844, comme vecteur du typhus exanthématique de São Paulo. Infections naturelles en specimens recueillis sur des chiens, dans un foyer de la capitale (São Paulo). *C. R. Soc. Biol.,* **127**:1377-1380, 1938.

8. *Travassos, J.* — Études éxpérimentales sur la transmission tu typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma striatum* Koch, 1844. *C. R. Soc. Biol.,* **127**:462-464, 1938.

9. *Travassos, J.* — Transmission éxpérimental du typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908. *C. R. Soc. Biol..* **127**:1375-1376, 1938

# O CRESCIMENTO INTERFÁSICO DO NÚCLEO

## *Pesquisas cariométricas sôbre a espermatogênese dos ofídios (*)*

POR GIORGIO SCHREIBER

*(Da Escola Livre de Sociologia e Política, Instituição Complementar da Universidade de São Paulo e do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

SUMÁRIO



---

(*) Pesquisas executadas no Laboratório de Citogenética do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, subvencionadas por uma bolsa dos Fundos Universitários de Pesquisa da Universidade de São Paulo.

Recebido para publicação em 22-4-947.

## I) INTRODUÇÃO

### a) *O problema do crescimento interfásico do núcleo.*

Num campo de pesquisa tão vasto e cheio de brilhantes descobertas e de possibilidades experimentais, como é a citogenética, pode parecer inútil e banal, limitar-se ao estudo do volume do núcleo. Alguns fenômenos que serão considerados e discutidos no curso do presente trabalho permitem considerar o estudo do volume nuclear sob uma visão mais otimista e convencer-se que ainda a simples medida do volume nuclear, quando feita sôbre material convenientemente escolhido e com tôdas as reservas e objeções, aliás, perfeitamente justificadas relativas aos mecanismo genéticos, metabólicos e geométricos que determinam o volume nuclear, pode-nos fornecer contribuições de notável interêsse no estudo dos mecanismos fundamentais do genoma.

O volume no núcleo é o resultado de uma série extremamente complexa de fenômenos químicos, físicos e fisico-quimico que atuam não somente sôbre o volume, mas também sôbre a superfície do núcleo e, portanto, a fórma geométrica dêste corpo adquire uma significação de importância notável.

Existem indubitavelmente algumas condições que modificam o volume nuclear de modo totalmente independente do genoma. Devemos, todavia, frisar que em outras condições o genoma, na sua expressão quantitativa, está ligado ao volume nuclear de modo absolutamente rígido. Um dos fins dêste trabalho é a especificação de algumas destas condições.

As técnicas citogenéticas que permitem, hoje, uma análise do genoma tão íntima no que se refere ao número e à constituição dos cromosomas (número e disposição de cromonemas, espiralisação, cromocentros, heteropicnose, etc.) infelizmente quase nada nos podem dizer do que acontece no período no qual os cromosomios não está visíveis, isto é, na interfase.

Os estudos citoquímicos sôbre os ácidos nucleinicos vão preencher parte desta lacuna. As pesquisas das Escolas de Caspersson e de Brachet (9) nos permitem ver no futuro u'a maior compreensão da natureza de ao menos parte dos fenômenos metabólicos que caracterizam a interfase.

Não podemos esquecer que êste período é tão importante para a vida das células como e até mais do que as fases da mitose e da meiose. Os fenômenos da divisão nuclear são as manifestações finais de um ciclo no curso do qual os gens se multiplicam e atuam no citoplasma. A atividade efetiva do genoma se dá na interfase e não nas fases nas quais os cromosomas são reveláveis pelas técnicas citológicas comuns. O fenômeno fundamental da vida, a autoreprodução

do gen. é um fenômeno interfásico, e os virus que o apresentam como única manifestação típica que os separa do mundo mineral faltam totalmente de tôdas as manifestações do ciclo cromosômico.

Qualquer contribuição que nos permita indagar quer diretamente quer indiretamente esta interfase, vem contribuir ao estudo do fenômeno fundamental da biologia: a reprodução dos gens. É, portanto, justificado insistir no estudo de um fenêmeno tão simples e grosseiro como a variação volumétrica do núcleo, mesmo se as interpretações forem depois sujeitas a uma necessária verificação por meio de outros métodos mais refinados ou de hipóteses acessórias que, devidamente discutidas, poderão nos indicar novos rumos de pesquisas.

* * *

As presentes pesquisas, executadas sôbre material bastante especializado, representam a extensão de uma série de estudos levados a termo sôbre outros materiais, durante os quais apareceu a necessidade de estudar o desenvolvimento do núcleo durante a interfase, como problema básico para a interpretação dos fenômenos que se vinham revelando pelo estudo quantitativo do volume nuclear.

Além disso, a confusão existente na literatura sôbre as relações entre o volume do núcleo, a sua superfície e o seu conteúdo em cromosomas, levaram o autor à convicção de que era preciso esclarecer êstes pontos antes de tentar a interpretação de novos fenômenos de ordem cariométrica, que se verificam, por exemplo, no curso do desenvolvimento embrionário.

As relações estreitas entre o tamanho do núcleo (em volume e superfície) e aquêle do citoplasma são um outro problema, que visam mais os efeitos dos gens no desenvolvimento e funcionamento das células do que os próprios fenômenos da reprodução dos gens. Isto, às vêzes, contribue para complicar as interpretações das pesquisas de citologia quantitativa, e precisa sempre não esquecer que o citoplasma não é todo diretamente implicado na vida do genoma, mas uma parte dêle está mais ou menos fóra do ciclo e inerte, especialmente nas células embrionárias (Conklin 12). De outro lado vários fenômenos mostraram que no citoplasma ativo das células embrionárias existem materiais de origem nuclear cuja incorporação no núcleo se procede progressivamente nas segmentações sucessivas (Godlewsky 22, Brachet 9), e mesmo nas células adultas materiais citoplasmáticos de natureza nucleínica concorrem ao abastecimento do núcleo durante o processo de duplicação interfásica; como também materiais nucleínicos formados no núcleo em relação com o processo de duplicação dos gens podem passar ao citoplasma especializado das células glandulares (Painter 42).

É, portanto, absolutamente necessário esclarecer o que acontece nas células em condições normais, e confrontar, depois, êstes fenômenos com os que se verificam nas condições mais especializadas acima especificadas. Os blastômeros, especialmente, não são ainda células definitivas, pois têm capacidades prospecticas mais amplas do que as células do organismo desenvolvido. Não há dúvida que, apesar dos resultados das clássicas pesquisas de embriologia experimental sôbre a totipotência nuclear durante o desenvolvimento, os fenômenos de especialização celular têm uma altissima significação para interpretar a função do genoma no desenvolvimento, provavelmente em relação com a estrutura ou constituição dos materiais do citoplasma recebidos e segregados durante a segmentação (Morgan, 40 — Goldschmidt, 23, etc.). Portanto, para evitar estas complicações, o estudo do mecanismo normal da duplicação dos gens deve ser abordado prevalentemente nas células que estejam em uma situação a mais possível definitiva.

* * *

O estudo do crescimento interfásico do núcleo não é sempre fácil e vários foram os rumos seguidos pelos pesquisadores.

O estudo do macronúcleo dos Infusórios, levado a termo especialmente por Popoff (18), foi a primeira tentativa neste campo; todavia, êste material nos parece especializado de mais para ser confrontado diretamente com o núcleo das células dos metazoários. Provavelmente, o macronúcleo representa um núcleo fortemente aumentado por repetidas endomitoses e, portanto, os fenômenos podem ser aqui mais complexos.

Outra possibilidade do estudo do aumento nuclear existe com as culturas "in vitro" e de fato a escola russa de Wermel (58) alcançou resultados básicos que serão examinados mais adiante.

Um terceiro método de análise da interfase consiste no estudo estatístico de uma "população" de núcleos homogêneos em reprodução ativa. As frequências dos diferentes tamanhos encontrados estão relacionadas com as velocidades de variação dos tamanhos. Este foi o método usado nas presentes pesquisas e o material, as espermatogônias de ofídios, revelou-se particularmente interessante. O mesmo método aplicado aos maristemas vegetais levou às mesmas conclusões obtidas nas espermatogônias. Por êste fato acreditamos que a coincidência dos resultados obtidos em materiais tão diferentes não seja casual, mas reflita a realidade com uma boa aproximção. Examinemos, portanto, êste método mais detalhadamente.

b) *Os fundamentos do método cariométrico no estudo da interfase*

1) *Relação entre genoma e volume nuclear. Frequência dos volumes e velocidade de crescimento.* As pesquisas cariométricas que abriram tôda uma série de estudos quantitativos sôbre os núcleos foram iniciadas por Jacobj na escola de Heidenhain (32-35).

Medindo o volume de um certo número de núcleos e distribuindo os volumes em classes estatísticas de frequência, êste autor verificou que êles são distribuidos com frequência de volume nuclear unimodais, sendo as curvas do tipo bem conhecido em fórma de sino (curva de Galton). Existem, porém, tecidos nos quais estas curvas apresentam duas ou mais classes de máxima frequência: Jacobj verificou que nestes casos os volumes das classes modais estão entre si em relação simples e constante, isto é, como 1:2:4:8:16:, etc..

Devemos salientar que esta variabilidade do volume nuclear não reflete somente a variabilidade flutuante casual, mas também, e principalmente a variação devida ao crescimento próprio dos núcleos. Portanto, as curvas de frequência não são exatamente curvas de Galton. Durante êste crescimento os núcleos passam de uma classe de volumes para outra: o fato de ter algumas classes frequência maior do que outras, indica que os núcleos nesse crescimento permanecem mais demoradamente em alguns volumes do que em outros. As classes de maior frequência representam, portanto, volumes nos quais os núcleos têm menor velocidade de crescimento, isto é, paradas do processo de crescimento.

Baseados nêstes postulados teóricos, nos é permitido estudar um fenômeno dinâmico como é o crescimento nuclear sôbre material fixado. Um sistema semelhante de análise de um processo dinâmico sôbre material estático é a determinação das velocidades relativas das diferentes fases cariocinéticas, deduzidas da porcentgem das diferentes fases verificadas nas culturas de tecidos fixados. Möllendorff (39) mostrou que êste processo oferece resultados satisfatoriamente concordantes com os resultados das medições diretas da duração das fases cariocinéticas em filmes microcinematográficos.

Resumindo o princípio dêste método, podemos dizer que a frequência de um estádio é diretamente proporcional à sua duração e inversamente proporcional à velocidade do processo no estádio em exame.

Voltando ao caso das curvas de frequência dos volumes nucleares, si as modas têm volumes múltiplos de dois (2:4:8:16.) podemos concluir que os núcleos durante o crescimento duplicam de volume. Durante êste crescimento i núcleo passa para volumes progressivamente maiores com uma sucessão de velocidades diferentes; parando ou retardando êste crescimento ao alcançar um volume duplo do inicial.

Este tipo de crescimento foi denominado "ritmico" ou, segundo se exprime Painter, "periódico".

As pesquisas de Jacobj, integradas nas considerações teóricas de Haidenhain (Protomeren-Theorie) mostravam que a matéria viva, célula ou núcleo, cresce por duplicação. Vários outros autores sucessivamente pensaram que o crescimento "ritmico" fosse devido à duplicação dos cromosomios e, afinal, dos gens. Geitler (20), especialmente, baseando-se nas suas pesquisas sôbre a endomitose e poliploidisação dos núcleos somáticos nos insetos considera o crescimento ritmico dos núcleos, descobertos por Jacobj, como verdadeiras endomitoses.

A demonstração efetiva dêste fato foi dada por vários autores entre os quais D'Ancona (13-14) sôbre o figado dos mamiferos em regeneração e Biesele, Poyner e Painter (7) sôbre os núcleos de tecidos neoplásticos. Estes últimos autores usando contemporaneamente a análise estatistica — cariométrica e citológica e a determinação do volume dos cromosomios, do volume dos nucléolos e do número dos mesmos, verificara a estreita dependência do volume nuclear do número de cromosomas, ou de cromonemas, componentes dos cromosomios. Com estas pesquisas elimina-se tôda e qualquer objeção que ponha em dúvida a correlação entre volume nuclear e duplicação do genoma.

Esses autores refutam várias outras interpretações do crescimento nuclear, pois a correlação entre classes de máxima frequência do volume nuclear e o número de "organizadores do núcleo" exclue de modo absoluto qualquer interpretação que não tome em consideração a duplicação dos constituintes do núcleo (*).

Sucessivamente (1944) Biesele (5,6) admitiu a existência de dois fatores que contribuem para o aumento do volume nuclear nos tumores. Em alguns núcleos a duplicação dos cromosômios provoca o aumento volumétrico, ao passo que *em todos* os núcleos há um aumento de volume independente do aumento cromosômico. Este fato, porém, agindo sôbre *todos* os núcleos é independentemente do fator genético cromosomico que age especificamente sôbre os núcleos poliploides ou politenicos.

Biesele, (6) mais recentemente, acha que a variação de volumes dos cromosômios observadas nos casos de leucemia, não seja devida a variações de número dos cromatídeos, mas sim a variações do conteúdo em proteinas

(*) "Hydration does not explain the periodicity of nuclear volumes, and it could not change the number of nucleolar organizer".

dos mesmos, e, portanto, acha que as conclusões de Biesele, Poyner e Painter, de 1941, no que se refere ao volume dos cromosômios devem ser revistas. Não queremos entrar aqui na discussão do problema específico do volume dos cromosômios, porém, é claro que o problema deve ser considerado caso por caso e quando há efetivamente variação no número dos "nuclear organizer" trata-se efetivamente de variação do número de cromatídios.

Precisa lembrar que os linfocitas são celulas um pouco especiais e das quais existem varias categorias diferenciaveis pelas dimensões e não estão bem classificadas e constituem ainda um provavel problema da hematologia. São portanto celulas que não constituem nas circunstancias usadas um material apto a tirar afirmações definitivas, mesmo não tendo por elas indicações no que se refere aos nucleolos.

Acrecentamos ainda que os trabalhos de Biesele (Cancer Res. 4. 232-235 1944. Am Natur. 78. 380-382. 1944. Cancer Res. 4. 529-539 1944. Cancer Res. 4. 540-546. 1944) evidenciam um comportamento no Rato diferente do Camondongo e os demais animais, no sentido que em certas condições (etade, regeneração etc.) o aumento do volume dos cromosomios se processaria por aumento da eucromatina e não por duplicação dos cromonemas.

Devemos salientar que este fato aliás muito interessante pelas relações funcionais (vitaminas, etc.) e pela relação de 1,5 as vezes encontrada, não considera o volume nuclear interfasico nas suas fases de crescimento, mas somente o volume dos cromosomios metafasicos. Estes dois fenomenos, pelos resultados mesmos de Biesele não sempre são em direta relação. Não devemos portanto confundir dois fenomenos diferentes. O volume dos cromosomios varia tambem em outras situações, diferentes daquelas consideradas por Biesele, por exemplo por fatores geneticos e representa segundo Federley um verdadeiro carater fenotipico.

Todos estes fatos portanto, esclarecem alguns fenomenos de ordem bioquimica, mas não afetam o problema fundamental do crescimento ritmico do nucleo durante a interfase, isto é proporcional a um volume básico.

* * *

Para resumir êstes fenômenos podemos dizer que:

1 os núcleos crescem duplicando de volume.

2 esta duplicação do volume é devida à duplicação do genoma.

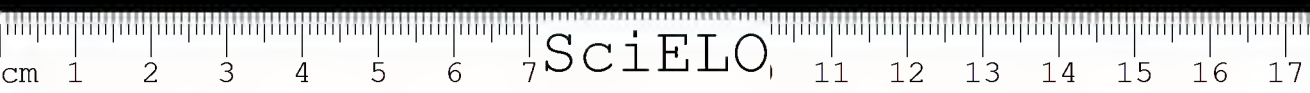
3 esta duplicação do volume se dá com velocidades diferentes, sendo que os núcleos param depois de alcançadas as etapas de duplicação.

Para fazer um confronto com o processo de crescimento geral dos organismos (ao qual com tôda probabilidade se submetem os núcleos também) podemos dizer que o crescimento do núcleo se pode representar por uma série de curvas "S" sucessivas, cada uma das quais representando um ciclo de duplicação dos gens nucleares.

Podemos representar êste ciclo como uma curva cumulativa da curva de frequência, sendo que nos casos das curvas polimodais, as "S" sucessivas, correspondem a ciclos de duplicação. Na realidade a transformação da curva de frequência em curva de crescimento deve-se fazer considerando a frequência como o inverso da velocidade.

Esta representação deve se considerar como puramente teórica pois outros fatores interferem na determinação da "variabilidade" estatística qual nos relevamos nos estudos da população de núcleos. Todavia, ela nos dá uma base para o estudo dinâmico do crescimento nuclear em material fixado.

A coincidência entre os ciclos de crescimento sucessivos e a variabilidade estatística foi verificada diretamente nas pesquisas da escola de Wermel (57) nas quais foram fotografados os núcleos de células em cultura de tecidos durante intervalos de tempo sucessivos. A curva dos volumes calculados sôbre êstes fotogramas é uma típica curva "S" em ciclos sucessivos e os volumes alcançados nos ciclos sucessivos correspondem aos valores modais das curvas de frequência construidas sôbre o material preparado histologicamente.

2) *Variações ritimicas do volume nuclear com relação 1:2.* Muitos autores assinalaram relações volumétricas entre os núcleos nas mais variadas condições: num mesmo tecido, entre tecidos diferentes da mesma espécie, entre os núcleos do mesmo tecido em épocas diferentes da vida do indivíduo (embrião, larva ou adulto), em condições patológicas como, por exemplo, entre um tecido normal e um neoplasma do mesmo tecido, etc. Uma detalhada revista bibliográfica destas pesquisas nos levaria longe demais; daremos somente a indicação dos mais significativos trabalhos nos quais estas relações têm sido verificadas (Jacobj, Clara G. Hertwig, Sauser, Freerksen, Wermel, D'Ancona, Beams e King, Sulkin, Keller, Muller, etc.), Geitler (literat. cit. Schreiber 49-50-52-53).

Todos êstes pesquisadores esclareceram de modo indubitável que o crescimento do núcleo se dá por alternância de periodos de rápido aumento com pausas nas quais o crescimento é mais vagaroso ou nulo.

As relações entre as classes de frequência máxima e o número de cromonemas que os constituem, nos indicam que êstes períodos de pausa correspondem a estádios poliploides ou politênicos. Especialmente o trabalho de Biesele Poyner, e Painter nos parece não deixar duvida neste ponto. O estudo contemporâneo do volume nuclear, do volume dos cromosomas, do volume aproximativo das fases mitóticas, e o número dos plasmosomas, deram a certeza de que os núcleos homólogos de um mesmo tecido mas com volumes diferentes têm valores múltiplos do genoma. Estes núcleos se formam por endomitose sendo possíveis tôdas as combinações entre a duplicação dos cromonemas e a dos centrômeros. Podem, portanto, existir no mesmo tecido núcleos com número diploide de cromosomas com um cromonema, (vol. 2), núcleos diploides com 2, 4, 8 cromonemas (vol. 4, 8, 16), núcleos tetraploides com 1, 2, 4, 8 cromonemas (vol. 4, 8, 16, 32) e assim por diante.

O número de plasmosomas, refletindo o número de "nucleolar organizers" indica o número de cromonemas e portanto, dos genomas.

Insistimos neste pormenor, pois achamos que esta constatação é de maior interêsse na interpretação dos fenômenos cariométricos estudados na presente pesquisa.

* * *

De outro lado uma vastíssima série de pesquisas nos vegetais poliploides mostraram também uma correlação direta entre volume nuclear e número de cromosomas. Nestas pesquisas, porém, frequentemente é tomado em consideração o volume celular em lugar do volume nuclear. Este fato, às vêzes, comporta variações da relação com o número de cromosômios devido à fracção de citoplasma inerte com vacúolos ou outras inclusões. Uma recente pesquisa de G. Schreiber (52) sôbre material rigorosamente controlado, seja como número de cromosômios, seja porque se refere à técnica cariométrica sôbre poliploides de café, trouxe uma ulterior confirmação à esta correlação.

3) *Variações rítmicas do volume nuclear com relação diferente de 2.* Estabelecida assim a natureza genética do crescimento rítmico por sucessi-

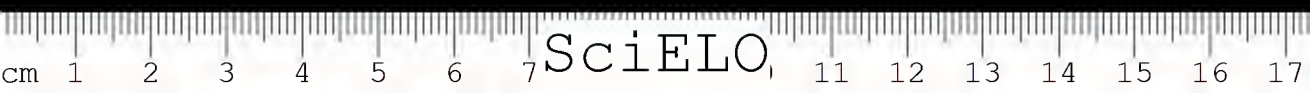
vas duplicações do volume nuclear, poderia-se pensar não ter dúvida nenhuma sôbre êste fenômeno. Porém, desde as primeiras pesquisas de Jacobj apareceram desvios desta regra e em alguns casos os valores modais das curvas de frequência estão em relação diferente de 2, com um algarismo geralmente inferior a 2.

Jacobj encontra na comparação entre núcleos de células hepáticas embrionárias, que êle considera como "Grundform" ou medida básica, com as espermatidias, uma relação de mais ou menos 1: 1,3. Êle considera essa diferença como não significativa e devida principalmente à diferente embebição de água (Wasseraufnahme).

É preciso dizer que em geral as indicações de Jacobj não são totalmente isentas de crítica do ponto de vista metodológico e que os julgamentos que êle faz das diferenças entre os valores reais e os que deveriam ser encontrados pela teoria de duplicação são frequentemente arbitrários.

É importante, porém, lembrar que na discussão surgida depois de uma comunicação de Jacobj (35) na Anatomiche-Gesellschaft de Bresslau, em 1931, Haidenhain, comentando as bases teóricas da sua doutrina do crescimento rítmico esclarece que se a divisão dos elementos unitários se procede sincronicamente dá-se o crescimento com duplicação (Verdoppenlunggesätz) (1:2). Se pelo contrário uma das duas metades do sistema se divide sucessivamente, então se verifica uma relação 1:3 ou seja definitivamente 1:2:3. : (0.5:1:1.5) ("... bei synchron fortschreitender Teilung erhalten wir das Verdoppelungsgesätz (1:2); wenn jedoch nur der eine Paarling sich weiterhin teilt, so bekommen wir das Verhältniss 1:3").

Voltaremos em seguida sôbre êste ponto que nos parece de maior interêsse na interpretação da natureza destas classes de frequência intermediária. É importante, todavia, frisar que Jacobj não dá a êles a importância devida. Sucessivamente Freerksen (19), aluno de G. Hertwig encontra valores de frequência máxima que estão em relação de mais ou menos 1:1,3. Êstes valores são encontrados nos eritroblastos dos quais êle reconhece gerações sucessivas de tamanho decrescente.

Quem porém, deu a estas exceções à regra de duplicação uma importância significativa foi Wermel. Êste autor com uma série de colaboradores publicou um notável número de contribuições sôbre o crescimento das células e do núcleo. Wermel chama êstes valores "Zwischenklassen" ou "Unterklassen" e apesar de não dar uma interpretação causal, as considera

como reais exceções à lei da duplicação e não como fenômenos concomitantes de ordem metabólica. Wermel e Scherschulskaya (59) encontraram a relação 1:1.5 entre dois modos do volume nuclear das células gordurosas do bicho da seda. Bogoyawlensky (8), da mesma escola russa, encontrou valor 1:1.5 (média de 1,7 — 1,6 — 1,42 — 1,49) entre as classes de frequência máxima nas células do intestino médio do mosquito.

Devemos salientar aqui que em todos êstes casos trata-se sempre de valores estatísticos cuja significação está entre certos limites de exatidão e, portanto, uma delimitação dêstes valores não é sempre possível; êsse fato será para nós de grande interêsse na discussão sôbre a natureza destas classes intermediárias pois entre as diversas interpretações teóricas a escolha dever-se-ia fazer exclusivamente na base do real valor do módulo, quando não seja possível uma verificação citológica.

Dois autores consideram estas classes intermediárias com interêsse particular tentando uma explicação teórica da sua natureza. G. Hertwig já tinha estudado o problema do crescimento rítmico dos núcleos e considerado êste como estritamente relacionado à duplicação do conteúdo cromosômico. Em 1932 Hertwig (25) considerou sob êste ponto de vista os núcleos gigantes das glândulas salivares dos dipteros cuja constituição múltipla em termos cromosômicos está hoje bastante bem estabelecida.

Num trabalho sôbre os desvios da regra da duplicação dos núcleos (29) êle toma em consideração as pesquisas de Freerksen, Jacobj e Erich, respectivamente no pronefros, nas glândulas mamárias e nos ductos de outras glândulas nos quais os núcleos crescem a 40-50% do volume esperado pela duplicação. Além disso Hertwig confronta os núcleos no cerebelo de dois indivíduos (os núcleos das células da neuroglia e dos grânulos). Os volumes nucleares são iguais nos dois indivíduos ao passo que as células de Purkinye estão num indivíduo 1,5 maiores do que no outro. Em outros indivíduos o mesmo autor encontra as seguintes relações:

Em três indivíduos : grânulos:Purkinye=1:16
Em um indivíduo ; grânulos:Purkinye=1:32
Em cinco indivíduos ; grânulos:Purkinye=1:24.

Isto é, as células de Purkinye podem estar em indivíduos diferentes em relação de 1:2 ou 1:1,5.

No Congresso Internacional de Citologia em Zurich (1937) Hertwig considerou êstes valores de 1:1,5 como devido à duplicação num núcleo diploide de somente a parte materna ou da parte paterna. Assim os núcleos estão 3 ou 6 etc. vezes maiores em lugar de 2 ou 4 etc. vezes.

Hertwig, porém, repudiou no trabalho de 1938 esta interpretação, sem dar uma justificação, mas somente por achar mais provável uma nova interpretação sôbre outra base. Relatamos aqui brevemente esta interpretação.

Hertwig parte das pesquisas de Boveri nas quais êste autor acha ser o número de cromosômios proporcional a superfície nuclear e não ao volume. Assim, núcleos haploides estão aos diploides como 1:2. $\sqrt{2} = 2{,}828$.

Outros trabalhos no campo da embriologia experimental deram indicações semelhantes; (Hinderer e Landauer), Herbst, 1919, especialmente encontrou ovos de ouriço do mar com quatro tamanhos de núcleos diferentes; Herbst acha serem estas classes nucleares devidas à quantidades diferentes de cromatina respectivamente 2 ou 4 vêzes mais. Os volumes dêstes núcleos estão em relação

1023 : 2144 : 2752 : 3918.
I II III IV

As classes I, II e IV, representam núcleos duplicados ao passo que a II seria segundo Herbst afetada por um fator desconhecido que induziria o núcleo a variar de volume até ter uma superfície dupla da classe II. Hertwig acha esta interpretação de Herbst aplicável a todos os casos de "Zwischenklassen" e admite a existência de dois tipos de relações entre o número de cromosômios e tamanho nuclear. Num tipo o número de cromosômios seria proporcional ao volume nuclear, no outro seria proporcional a superfície. Núcleos de igual número de cromosômios, mas nos quais atuam os dois diferentes fatores de correlação, teriam volumes que estariam em relação como $1 : \sqrt{2}$ isto é 1 : 1,41.

Para confirmar a sua tése Hertwig relata ainda dois casos. O primeiro é tirado do trabalho de Hvitzische e Tanner. No epitélio intestinal do rato mantido à nutrição cárnea aparece nas pesquisas cariométricas u'a moda intermediária entre as duas que se encontram normalmente. Hertwig interpreta êste fato como consequência do aumento funcional das células que mobilitaria o fator que relaciona o conteúdo nuclear com a superfície do núcleo.

O segundo é um trabalho de Katsuki, da escola de R. Hertwig. Confrontando os tamanhos nucleares dos ovocitos e espermatocitos de Ascaris em três estádios diferentes (início, metade e fim do período de crescimento) a série dos valores do espermatocito tem três modos que estão alternados com os modos das séries dos ovocitos. Conforme a interpretação de Hertwig as fases femininas seriam de mais ou menos 1,41 maiores do que as correspondentes fases masculinas. Uma relação mais ou menos semelhante (1,34) foi verificada por Sauser (44) na comparação das células intestinais dos machos e fêmeas de Ascaris.

Parece-nos que o trabalho de Hertwig apesar de ter muitas indicações efetivamente interessantes é viciado por uma visão teórica muito fraca.

* * *

O segundo trabalho que considera estas etapas intermediárias do crescimento nuclear é o de Brumelkamp (11) baseado, porém, sôbre fenômenos bastante diferentes. Êste autor parte também de uma comparação entre medidas nucleares encontradas na literatura e que tem uma relação diferente de dois. A comparação é feita entre materiais muito heterogêneos como, por exemplo, entre os dois máximos de frequência dos volumes nucleares de histiocitos da galinha; entre os núcleos do fígado de rã; entre os núcleos do rim, do embrião humano e do recem-nascido; entre os núcleos das células da glândula parotis confrontados com os núcleos do ducto secretor; entre os núcleos de células de Leydg intersticiais de idade diferentes ou patológicas; entre os núcleos de fígado de espécies diferentes (Faisão: galinha, cobaia: coelho, truta macho: fêmea, Ascaris, macho: fêmea, etc.). Além disso são considerados vários casos patológicos como células hepáticas e dos capilares biliares na cirrose, células neoplásticas confrontadas com as correspondentes células normais.

Em todos êstes casos, num total de 36, Brummelkamp encontra relações cujo valor está muito perto do algarismo $\sqrt{2}$. Os desvios do valor real com o valor teórico (por exemplo $0.96\sqrt{2}$ ou $1.05\sqrt{2}$) são considerados como devidos a êrros de observação. Analisando sumariamente os elementos teóricos da interpretação dêste autor.

Brummelkamp tinha anteriormente estudado a aplicabilidade a diferentes espécies da fórmula de Dubois e de Snell concernente as relações matemáticas entre pêso do corpo e pêso do cérebro. Nestas pesquisas êle encontrou que um coeficiente desta fórmula varia nos diferentes casos considerados conforme a série geométrica $1/2$, $1/\sqrt{2}$, 1, $\sqrt{2}$, 2, etc.

A coincidência entre o fator $\sqrt{2}$ desta série é a mesma encontrada nas comparações entre as classes nucleares mencionadas mais acima, levou Brummelcamp a tentar uma interpretação da natureza das classes intermediárias.

A base para esta interpretação é a curva de crescimento do macronúcleo dos Infusórios estudada por Popoff.

Este tipo muito especializado de núcleo passa durante a intercínese por duas fases com diferentes velocidades de crescimento chamadas respectivamente "Funktionnelle Wachstum Phase" e "Teilungs Wachstum Phase".

Na primeira fase, de crescimento mais vagaroso, o núcleo cresce até alcançar um volume mais ou menos 1,32 vezes o volume inicial para depois na segunda fase com um crescimento muito mais rápido alcançar o duplo do volume inicial. Durante a primeira fase Brummelkamp verifica que quando o núcleo aumenta de um até 1,32, o citoplasma varia de um até 1,80. Como

o quadrado de 1.32 é 1.74 Brummelkamp acha poder considerar êste valor aproximadamente igual a 1,80 e portanto ser válida a relação K ~ C 1/2, isto é, o volume nuclear igual a raiz quadrada do volume do citoplasma. No caso da primeira fase o crescimento é tal que para uma duplicação do citoplasma o núcleo aumentaria de um valor proporcional a $\sqrt{2}$ vêzes o valor originário. O autor confessa não encontrar uma interpretação causal desta relação. Êle depois complica enormemente as coisas considerando as pesquisas de vários outros autores sôbre vários materiais que parecem indicar que a massa nuclear é proporcional a superfície celular ou seja K ~ C 2/3. Para demonstrar que as duas relações estão ambas válidas Brumelkamp constróe um diagrama em coordenadas logarítmicas no qual duas linhas retas com inclinação respectivamente 1/2 e 2/3 indicam as duas funções supracitadas, entre volume do núcleo e volume do citoplasma e volume do núcleo e superfície celular. Neste diagrama êle constata que as duas linhas são "aproximadamente coincidentes" na região do diagrama onde se encontram os dados da "Funktionelle Wachstumphase" e das células nervosas previamente estudadas por Bock. Ele acha, portanto, que ficando válida a proporcionalidade do volume nuclear com a superfície celular dá-se também a validade aproximada da relação entre o volume do núcleo e o do citoplasma K ~ D 1/2. Portanto, segundo Brummelkamp as classes intermediárias ou "$\sqrt{2}$ Klassen" como êle as chama, seriam representadas por núcleos de células nas quais o citoplasma teria duplicado e o núcleo teria aumentado de $\sqrt{2}$ vêzes o inicial conforme as aproximações acima explicadas.

Tudo isto nos parece absolutamente pura especulação não tendo nem uma base biológica que permita esta explicação. As duas fases do crescimento do macronúcleo tem, com certeza, uma significação biológica, considerando também que o coeficiente de variação térmica ($Q_{10}$) das duas fases é diferente e apresenta algumas relações com o comportamento dos núcleos na segmentação (Fauré-Fremiet, 18). O único ponto que achamos interessante na teoria de Brummelkamp é que as classes intermediárias representariam fases do crescimento intercinético do núcleo, o que não aparece absolutamente na teoria de Hertwig.

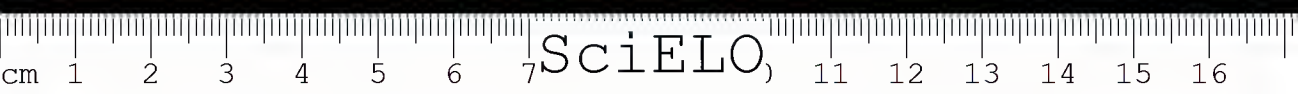
* * *

Achamos necessário relatar detalhadamente estas especulações de Brummelkamp e de Hertwig para esclarecer como se baseiam essas teorias nas quais o algarismo de $\sqrt{2}$ aparece como uma espécie de chave mágica

para a compreensão dêstes fenômenos. A explicação de Hertwig e puramente teórica com os dois fatores desconhecidos que relacionam o número de cromosômios uma vez ao volume e outra a superficie do núcleo. A teoria de Brummelkamp ê, apesar da sua estrutura matemática, totalmente arbitrária, sendo as aproximações admitidas de valor puramente subjetivo.

Ambas nos parecem carecer de base para uma explicação dos fenômenos de crescimento rítmico ou descontinuo com módulo diferente de 2 estando além disso. bem longe de qualquer relação com os fenômenos genéticos.

Mais recentemente a relação de 1:1,5 foi encontrada no estudo cariométrico dos núcleos cutâneos isolados, por D. Ziegler Kraemer (58). Esta autora verificou constantemente um aumento de 50% do volume depois do tratamento com os carcinogenos. Isto quer dizer que os volumes passam de um valor 1 a 1,5. Outra verificação desta relação foi dada por Salvatore e G. Schreiber (45) no ciclo do crescimento interfásico dos tecidos uterinos (seja endo que miométrio) nos quais foi verificada uma série de valores volumétricos "rítmicos" (modas das curvas de frequência) que seguem rigorosamente a série 1: 1,5: 2: 3: 4: 6: 8: 12, etc.

4) *Variações rítmicas do volume nuclear em sentido diminutivo.* Até agora temos considerado o crescimento descontínuo do núcleo e as relações entre as classes estatísticas de tamanho diferente na comparação entre núcleos de indivíduos ou de espécie diferentes ou em condições patológicas. Várias pesquisas, porém, mostraram que o volume nuclear pode apresentar uma série de valores proporcionais e descontinuos em sentido diminutivo. Sôbre certos aspectos êste fenômeno se depara mais simples como interpretação pois uma divisão sempre leva a formação de classes nucleares de tamanho geralmente da metade do inicial. Rarissimas vêzes a divisão nuclear leva a dois produtos de tamanhos diferentes. Êstes fenómenos poderiam por si mesmos endereçar a uma interpretação das classes de tamanho rítmicas em sentido rigidamente genético. O que varia nas divisões, equacionais ou reducionais é sempre o número de cromosômas, e, portanto, a proporcionalidade dos volumes deveria ser de óbvias interpretações. Mesmo na mitose normal nós devemos a rigor considerar o núcleo profásico como tetraploide e os dois núcleos filhos voltam a situação diploide.

A existência, porém, de reduções com intervalos volumétricos menores do dimidiação complica a situação e vem nos fornecer alguns dados pela interpretação das classes intermediárias em termos genéticos

* * *

Desde os primeiros estudos de Jacobj apareceu claro o dimidiação do volume nuclear na série espermatogênica. Os espermatocitos de primeira ordem, dos de segunda ordem, e os espermatídios estão em relação volumétrica de 4:2:1.

Mais um outro caso de redução rítmica do volume nuclear foi verificado na espermatogênese Além das indicações que já mencionamos de Jacobj (34) e Freerksen (19) na espermatogênese normal, G. Hertwig (28) e Spuhler (54) indicaram outros casos nos quais existe uma terceira divisão depois do espermatídio que dimidia mais uma vez o volume nuclear. Hertwig mostrou nestes casos que a relação entre o volume do auxocitos e o último produto das divisões espermatogenéticas é de 8 vêzes em lugar de 4 como de costume. Nos insetos, onde pela caracteristica estrutura testicular é possível contar o número de espermatozoides produzidos em cada quisto e possível portanto, determinar o número de divisões de cada espermatogônio. Neste caso, contrariamente ao que se verifica nos vertebrados parece se alcançar um volume 8 vêzes menor com somente duas divisões. Hertwig comentando êstes achados admite a possibilidade de que durante a divisão parte do conteúdo nuclear seja perdido no citoplasma analogamente ao que acontece nos conhecidos casos de "diminuição cromatínica" do Áscaris e do Ditiscus. Resultaria assim, em cada divisão, uma diminuição maior do que a metade.

Parecem-nos êstes fenômenos, se ulteriormente confirmados, ser do maior interêsse e ter uma certa analogia com os fenômenos que acontecem na ruptura da vesícula germinativa e mereceriam ser mais profundamente estudados tendo também presente o fenômeno inverso da reincorporação dêstes materiais nucleares do citoplasma durante a segmentação que já mencionamos.

* * *

Além da série gametogenética cuja interpretação em termos cromosômicos ê absolutamente clara devemos analisar aqui duas séries de fenômenos diminutivos, do volume nuclear: a dos núcleos dos blastômeros em segmentação, e a dos núcleos de tecidos já diferenciados nas fases mais adiantadas do desenvolvimento embrionário ou larval.

G. Hertwig (27-30) considera as sucessivas divisões dos blastômeros que levam a uma progressiva diminuição do volume nuclear no conjunto dêstes fenômenos cariométricos. Êle constata que esta redução se dá com dimidiação progressiva do tamanho nuclear e êle chama êste processo "Multiple Succedanteilungen". Para êste processo poder-se verificar, é necessário que os núcleos estejam inicialmente "mitosebereit" ou seja, prontos para a mitose. Isto se pode dar somente nos núcleos fortemente poliploides ou "polimeros" ou "politênicos ou "meertwertig" (conforme as denominações de autores diferentes para êstes dois últimos termos) isto é com os cromosômios em número múltiplo de um valor básico ou com os cromosômios constituidos pela reunião de um número múltiplo de cromonemas.

Devemos aqui lembrar que não sempre as divisões de segmentação levam os núcleos a um dimidiação nas sucessivas gerações de blastômeros. Entre uma segmentação e a sucessiva pode haver crescimento intertásico mais ou menos extenso. Além disso ao que parece das pesquisas de Godlewsky (22) os núcleos dos blastomeros seriam ligeiramente maiores do que a metade do núcleo progenitor por ter-se em cada geração de blastômeros incorporada no núcleo uma certa fração do material nuclear existente no citoplasma do ovo e que se tinha localizado alí no momento da ruptura da vesicula germinativa. Todos estes fatos nos parecem da maior significação pela interpretação a participação nuclear no desenvolvimento, mas devemos confessar que pouco ou nada foi feito até agora com rigoroso método quantitativo. Devemos lembrar aqui somente as pesquisas de Godlewsky (22), Conklin (12), Enriques (16-17) e Levi (36), sôbre as mais diferentes espécies animais que mostraram que o ritmo do crescimento total da massa nuclear nas sucessivas gerações de blastômeros não é igual nas diferentes espécies e em diferentes períodos da segmentação. Porém, um estudo comparativo sôbre o volume dos núcleos dos blastômeros durante o desenvolvimento nas diferentes espécies ainda não existe.

* * *

O fenômeno de dimidiação dos núcleos durante o desenvolvimento não é limitado à fase de segmentação mas continúa também nos órgãos especializados. Isto foi constatado estatisticamente por B. Schreiber e Angeletti (46), no estudo cariométrico do fígado durante o desenvolvimente da carpa (*Cyprinus carpio* var, *specularis*). Nos alevinos dêste peixe de 17 mm os núcleos hepáticos apresentam um poligono de frequência com u'a moda ao volume 18,8; os alevinos de 22 mm o máximo de

frequência é ao valor 9,4; a 40 mm o valor modal é 4,77. Os alevinos de 175 mm e os de 360 mm apresentam uma curva de frequência com 2 formas respectivamente, 4,77 e 9,4. Os alevinos de 540, 670, 760 mm têm três modas respectivamente. 4,77 — 9,4 — 18,8 e os de 850 mm também três modas: 9,4 — 19,8 — 37,6.

Podemos dividir, portanto, o desenvolvimento larval em dois periodos, o primeiro anterior aos 40 mm de comprimento, no qual o fígado apresenta uma diminuição do volume nuclear que se processa por dimidiações sucessivas. Alcançado um tamanho mínimo as células crescem ritmicamente, isto é, por endomitose, dando núcleos duplos, quádruplos e óctuplos do mínimo. O momento no qual êste valor mínimo é alcançado corresponde àquêle no qual se dá o início do diferenciamento citológico da célula hepática e do funcionamento específico (aparecimento de granulações e vacuolação do citoplasma). No estádio de 17 e 22 mm somente foram encontradas mitoses (mais ou menos 3%) ao passo que em nenhum outro estádio elas estão presentes. Isto leva os autores a considerar a diminuição do volume como devida a divisões sem crescimento interfásico ("Multiple Succedanteilungen" de G. Hertwig) ao passo que depois de 40 mm há crescimento interfásico sem divisão (endomitose).

Análogos fenômenos foram encontrados no embrião e adulto de pinto por A. Binda e relatados por B. Schreiber.

* * *

Em pesquisa destinada a controlar os fenômenos descritos por B. Schreiber e Angeletti, G. Schreiber e M. Romano-Schreiber (53) nos girinos de *Bufo vulgaris* encontraram uma situação um pouco diferente. Foi estudada a variabilidade do volume nuclear no figado e no pâncreas de uma série de girinos fixados em Padua (Italia) constituida de indivíduos de 10, 14, 29, 51, 72, 80 dias após a eclosão e de 7 estádios da metamorfose de idade entre 72 e 100 dias. Depois de iniciada a metamorfose a indicação em dias não é mais conveniente devido a notável variabilidade individual do andamento da metamorfose. Portanto a partir do início desta foi convencionalmente indicado o estádio padrão previamente estabelecido por G. Schreiber (47) por esta espécie.

Para cada estádio foi calculado o valor modal das curvas de frequência nuclear. Pelas razões já expostas foi êste o valor utilizado como representativo do volume nuclear em cada estádio.

Como se vê na Figura 1, e diagrama que representa êstes valores modais em função do tempo (idade ou estádio) o volume do núcleo di-

minue ritmicamente, isto é, de modo descontínuo e com valores proporcionais. O módulo desta proporção foi apontado aproximadamente como 1,41 para confrontá-los com os dados de Brummelkamp e de G. Hertwig ficando, porém, com reserva a respeito da realidade dêste algarismo. Do

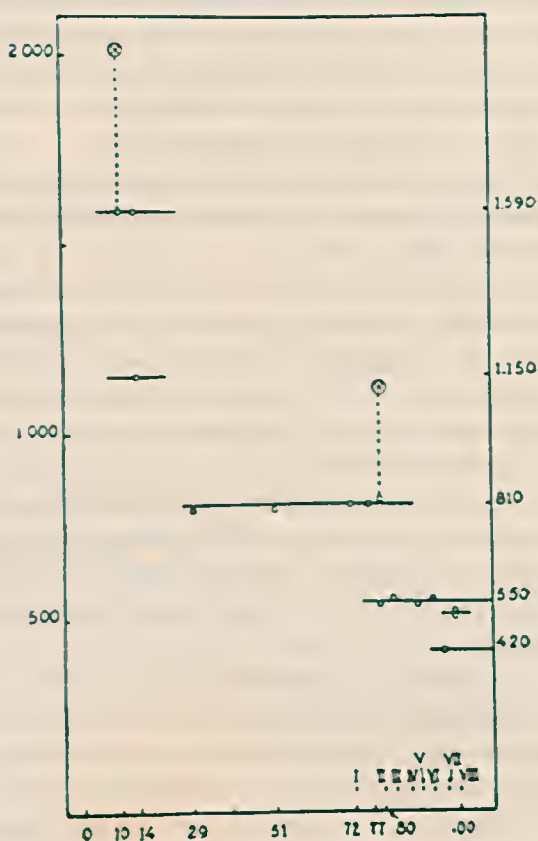



Fig. 1

Volumes nucleares (valores modais) durante o desenvolvimento do fígado dos girinos de *Bufo*.
Em abcissas — estádios de desenvolvimento (dias).
Em ordenadas — volumes nucleares (à direita, valores médios dos diferentes níveis)
⊖ profases.

(de Schreiber & Romano-Schreiber modificado.)

exame do diagrama pode-se constatar que durante todo o período premetamórfico dos núcleos ficam a um certo volume (810). Logo antes da metamorfose dá-se uma redução. Durante a metamorfose até o seu acabamento o núcleo fica ao nível 550 e num estádio final da metamorfose êle diminue ainda alcançando o nível de 420.

Nos dois esádios mais precoces de 10 e 14 dias o núcleo tem os valores de 1600 e 1200. Nestes dois estádios e no 77 dias, isto é, logo no começo da metamorfose encontram-se numerosas mitoses e a variabilidade è maior. Nestes estádios foram medidos os volumes das profases com a reserva, porém, de, estando os núcleos em profases elipsoides de rotação a sua orientação livre no espaço proporciona um notável erro nas medidas. Apesar desta reserva os volumes das profases (indicadas no diagrama com (x) ) estão coincidindo com notável aproximação ao volume do nivel imediatamente superior ao da interfase correspondente.

Também no *Bufo*, como foi mencionado para carpa o diferenciamento histológico do fígado e o início da sua funcionalidade coincide com o volume mínimo alcançado pelo núcleo.

Estamos aqui diante de um caso típico de "Zwischenklassen", cuja interpretação se apresenta mais difícil do que a da endomitose. G. Schreiber (49), esboçou uma explicação baseado na sua interpretação geral destas classes intermediárias. Êle adotou substancialmente a explicação de Heindenhain e a primeira de G. Hertwig, isto é, da duplicação de somente metade do conteúdo nuclear. Em termos genéticos esta explicação leva-nos a admitir que os dois genomas haploides teriam diferentes velocidades de duplicação ou a duplicação de um genoma seria sucessiva aquela do outro assim que, num estádio transitório um dos dois seria já duplicado e o outro ainda não. Seria, portanto, uma situação correspondente a um triploide transitório.

Os valores volumétricos, admitindo que o volume nuclear exprima fielmente o valor quantitativo do genoma seria portanto de 1,5 maior do que o precedente. As relações entre as etapas de crescimento sucessivas seriam, portanto, tomando como o valor volumétrico de um núcleo diploide. 1: 1, 5: 2: 3: 4: 6: 8. etc.. Os módulos seriam então alternadamente 3/2 e 4/3. isto é, 1,5 e 1,33.

No trabalho de 1943 foi frisado que por acaso a média aritmética entre 1,5 e 1,33 é 1,415 e, portanto, a coincidência dêste valor com o algarismo de $\sqrt{2}$ (1,413) teria encaminhado Hertwig e Brummelkamp para as interpretações que foram examinadas acima e que, portanto, poderiam carecer de fundamento. A notável variabilidade dos dados estatísticos não permite sempre uma exata avaliação dos módulos e, portanto, no conjunto das diferentes pesquisas, o valor médio de 1,41 aparece mais frequentemente.

Foram indicadas várias provas da natureza citológica dêste fenômeno como também num trabalho sucessivo, de 1946, foram indicadas outras interpretações que porém não alteram a essencia do fenômeno.

A série diminutiva dos volumes nucleares de *Bufo* seria determinada pela combinação do crescimento interfásico limitado a 1,5 vêzes com um divisão por dimidiação dêstes núcleos, sempre naturalmente em núcleos politênicos ou poliploides.

No pâncreas dá-se absolutamente a mesma situação, ligeiramente complicada pela existência, às vêzes, de curvas de frequência bi-modais nas quais, porém, os dois valores modais estão dentre os valores da série descrita.

Esta redução do volume nuclear nos estádios sucessivos de desenvolvimento pode induzir a uma interpretação diferente e pensar em um "efeito estatístico" que modificaria o valor médio ou modal do volume nuclear. Poder-se-ia pensar na existência no tecido de categorias de células diferentes por tamanho (poliploides), que predominariam como número nos estádios sucessivos de desenvolvimento por desaparecimento das que predominavam no estádio precedente. Em outras palavras poderia haver proliferação diferencial em períodos diferentes de categorias diferentes de células. O problema é evidentemente básico e foi discutido desde o primeiro trabalho de Schreiber e Romano-Schreiber. Num trabalho mais recente de Salvatore e Schreiber, fenômenos semelhantes foram verificados nas células uterinas e neste caso a perfeita pureza das curvas de frequência dos volumes nucleares permite excluir a existência de categorias diferentes de células desde os estádios iniciais. Além disso, existem fenômenos semelhantes de redução do valor poliploide de células somáticas durante o desenvolvimento embrionário perfeitamente controladas citologicamente (Berger e sua Escola no intestino das larvas de mosquito) que autorizam a pensar em fenômenos do mesmo tipo também nos tecidos somáticos dos vertebrados. Êste fenômeno foi denominado por G. Schreiber em 1943 (49) com o termo de "elasse" (do grego — elassis) que significa redução mas não pode confundir-se com outros fenômenos reducionais como a meiose ou a "chromatin diminution".

Depois destas pesquisas sôbre o *Bufo*, Dussa (1944) (15) verificou também uma diminuição volumétrica do núcleo no fígado dos girinos, mas segundo êste autor esta não seria "ritmica" mas sim devida a fenômenos de hidratação nuclear. Não tendo podido por causa da situação atual alcançar o trabalho original de Dussa, achamos inutil por enquanto contestar aqui êstes resultados. Sucessivamente (1945) Paccagnella (41) verificou no Axolotl a redução ritmica do volume nuclear durante o primeiro ano de vida, seguida no segundo ano por um aumento do volume segundo a série de duplicação. Isto é exatamente como na Carpa. Paccagnella encontra também as "Zwischenklassen" de 1,5 vêzes o volume básico.

Êste autor interpreta a diminuição do volume nuclear como devida à prevalência em períodos sucessivos de células diploides, em seguida ao desaparecimento das tetraploides prevalentes nos estádios precedentes. Êste problema já foi discutido mais acima.

Achamos necessário conhecer mais profundamente o que acontece durante a interfase antes de nos permitir uma interpretação definitiva dos fenômenos de redução rítmica e especialmente dos de redução com as classe 1.5.

5) *Fim do trabalho e escolha do material.* O problema do crescimento do núcleo como foi até agora examinado abrange o problema mais complexo e importante da multiplicação dos gens e a duplicação dos cromosômas no núcleo interfásico.

Para ter a possibilidade de deduzir algo sôbre êste fenômeno em base aos estudos cariométricos é absolutamente preciso estabelecer antes se o volume do núcleo corresponde a situação quantitativa do genoma, ou se esta correspondência não estiver perfeita em quais condições esta correspondência é válida.

Já mencionamos que uma possibilidade de esclarecer êste problema é o estudo cariométrico dos poliploides. Muitos trabalhos foram feitos especialmente no campo botânico neste sentido. G. Schreiber (52) verificou mais uma vez esta correlação numa série de plantas poliploides de *Coffea*, e analisou nesta ocasião as condições que devem ser observadas nas pesquisas para poder ter confiança nos resultados.

Outro campo de pesquisas nos é fornecido pelos trabalhos sôbre a espermatogenese como os de Jacobj (33), Freerksen (18), Hertwig (24,27), Wermel (55), Spuhler (54), e B. Schreiber (45). Tôdas elas verificaram, apesar de certas discordâncias, como no caso dos insetos (Wermel, 56), que, ao menos na maioria dos casos, a correlação entre o valor múltiplo do genoma e o volume nuclear é perfeita.

Poderia, portanto, parecer inútil voltar neste assunto, mas achamos que em tôdas as pesquisas precedentes foi dada pouca atenção ao espermatogônio.

De fato esta categoria de células testiculares está fóra da série meiótica e tem por sua conta uma série de ciclos mitóticos independentes da meióse. Alguns animais apresentam antes de iniciar a meiose uma série de divisões espermatogôniais sucessivas nas quais o volume nuclear dêstes gônios diminue progressivamente. Não queremos aqui entrar na análise dêste fenômeno que nos parece muito semelhante ao da "elasse" embrional que foi analisado a propósito do fígado.

O que achamos interessante, aqui, é confrontar os núcleos das espermatogônias durante o seu crescimento interfásico, com os núcleos das fases

meióticas. Nós temos aqui uma situação que achamos preciosa: isto é, a possibilidade de ter no mesmo tecido, e, portanto, sujeitos às mesmas alterações devidas ao tratamento histológico, um núcleo em crescimento interfásico e uma série de núcleos cuja constituição cromosômica está bem conhecida e que se dividem sem crescimento interfásico.

Temos, em linguagem figurada, um núcleo que percorre um caminho: os marcos milliários ao longo dêste caminho marcam etapas sucessivas correspondentes ao número de genomas.

A dificuldade que a maioria dos animais apresenta para um estudo cariométrico das espermatogônias é que os núcleos destas células são geralmente de fórma não perfeitamente esférica; frequentemente achatado, ou deformado nas mais variadas direções. Uma apreciação do volume dêstes núcleos seria, portanto, muito aleatória.

Já foi discutido o problema da fórma do núcleo nas pesquisas cariométricas (G. Schreiber, 52) e não queremos voltar aqui neste assunto. Achamos somente que algumas das pesquisas cariométricas, que se encontram na literatura, estão viciadas por êste defeito. Nos ofidios, esta dificuldade não existe, pois, na totalidade das espécies que foram examinadas no presente trabalho, os núcleos espermatogôniais são perfeitamente esféricos.

* * *

No crescimento do núcleo da espermatogonia devemos distinguir duas fases nitidamente diferentes: uma é o crescimento interfásico das mitoses proliferativas; a outra é o crescimento auxocitário que leva o espermatogônio, depois da última mitose gonial, a se transformar em espermatocita de primeira ordem.

A diferença entre estas duas interfases é substancial, pois, no segundo tipo se dão o pareamento e o "crossing-ower" dos cromosomas que são os fenômenos fundamentais da sexualidade. Qual é a causa pela qual, depois de um ciclo mitótico, o núcleo gonial desvia para o crescimento auxocitário, nós não conhecemos. Com certeza, acontece um fenómeno de endomitose, pois, os gens duplicam-se, os cromosômios se desdobram, sem se formar antes o fuso nuclear e a divisão dos centrômeros. A essencia do fenômeno, como é concebido por Darlington é uma precocidade de algumas das manifestações da divisão respeito a outra. De qualquer modo o resultado é um núcleo tetraploide ou tetravalente, isto é, com 4 complementos de gens haploides e, como será ilustrado mais adiante, o volume do auxocito no fim do seu crescimento (paquiteno) corresponde perfeitamente ao volume da profase espermatogonial (4 n).

Podemos, portanto, confrontar as duas interfases que temos examinado antes: interfase das mitoses goniais e interfase auxocitária. O intervalo de crescimento é o mesmo. O que nestas pesquisas se revelou é a diferença do rítmo dêste crescimento.

Levi e Terni (37) analisaram o crescimento auxocitário nos anfíbios do ponto de vista citométrico, mas os resultados não nos fornecem dados esclarecedores no que se refere ao volume nuclear e achamos muito importante analisar mais profundamente êste assunto no futuro.

* * *

Para resumir esta introdução podemos definir o fim destas pesquisas como o estudo cariométrico dos núcleos das espermatogonias em ativa multiplicação mitótica confrontando com os estádios de variação do volume nuclear das fases da meiose com número de cromosômios conhecido.

A situação topográfica no lumem do canalículo e o aspecto morfológico dos núcleos nos proporcionam a possibilidade de reconhecer com absoluta certeza as 4 categorias de células germinais e obter assim polígonos de frequência perfeitamente puros de cada tipo de células.

## II) MATERIAL E MÉTODOS

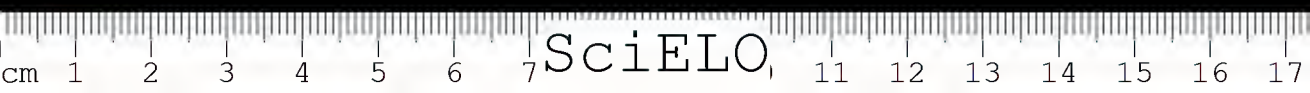
### a) *Escolha do material*

As pesquisas foram realizadas sôbre os testículos de ofídios brasileiros, aproveitando o copioso material vivo que chega continuamente ao Instituto Butantan de tôda parte do Brasil.

O material foi colhido em diferentes épocas do ano, sendo, portanto, para cada espécie, escolhida a época de maturação. Na descrição dos resultados será dada, para cada caso, a indicação do gráu de maturidade sexual do testículo estudado. Em alguns casos foi estudado também o testículo em fase juvenil ou em repouso. De uma espêcie foi possível estudar um testículo embrional (*Xenodon*).

### b) *Técnica histológica e embriológica*

Os testículos, colhidos em ligeira narcose etérea ou clorofórmica, foram fixados quase todos em líquido de Dubosq-Brasil (Bouin alcoólico) em pequenos pedaços bem abertos, de fórma a apresentar a superfície in-

terna do testiculo ao fixador. Praticamente isto se obtem facilmente abrindo o testículo com uma tesoura com um corte longitudinal e revoltando para fóra a parte interna do testículo, ficando assim, a massa esponjosa dos canalículos em direto contacto com o fixador.

Este procedimento permite sempre contar os cromosômios nas metafases das primeiras divisões e a perfeita visibilidade dos quiasmas nas diacinesis dos espermatocitos de primeira ordem.

Os cortes foram feitos geralmente de 10 a 12 micra, coloridos com Hematoxilina de Harris ou de Heidenhain com eosina.

As medidas foram executadas desenhando com a câmara lúcida a uma amplificação de 1890 de mais ou menos duzentos núcleos de cada estádio, sendo porém às vêzes, bastante difícil encontrar suficientes espermatocitas de segunda ordem.

Sôbre os desenhos assim obtidos foram medidos os dois diâmetros cruzados (maior e menor) e feita a média aritmética destas medidas. O valor do diâmetro médio (em milímetros a ampliação do desenho) foi usado como variável estatística, grupados em classes de meio milímetro e feita a curva de frequência.

A medida dos diferentes tipos de núcleos é facilitada pela possibilidade de reconhecê-los imediatamente, seja pela localização, seja pelo aspecto morfológico. Às vêzes, foram medidos juntos os núcleos dos espermatocitos de segunda ordem e das espermatidas devido a dificuldade de encontrar os primeiros e somente foram depois separados na curva de frequência as duas modas nitidamente distintas. Dos espermatocitos de primeira ordem foram medidos somente as fórmas de paquitenos e diplotenos e não as de leptotenos que estão ainda em crescimento interfásico (êste fenômeno será objeto de um trabalho sucessivo) e as fases de diacinese, que se apresentam às vêzes mais deformadas.

As espermatogonias estão estritamente localisadas imediatamente em baixo da parede do canalículo e se distinguem perfeitamente das primeiras fases do auxocito como também dos espermatocitas de segunda ordem, que têm mais ou menos o mesmo tamanho. O núcleo das espermatogonias é perfeitamente esférico e isto foi uma das razões pela qual as medidas deram um resultado bem claro. As profases das espermatogonias, pelo contrário, estão mais eliticas e não orientadas. As suas medidas, portanto, não têm uma exatidão tão grande como as dos outros estádios. Estas medidas, portanto, não foram utilizadas nos cálculos da curva de regressão e as indicações foram dadas como média aritmética das medidas individuais ou em poucos casos onde as profases se encontram mais frequentes como moda.

c) *Elaboração estatística dos resultados*

Das curvas de frequência dos diâmetros foram calculados os valores modais por perequação das frequências e aplicação da fórmula:

$$Mo = L_{mo} + \frac{F}{F \times f} \times i$$

onde $L_{mo}$ é o limite inferior da classe modal, F é a frequência da classe superior à da moda *f* a inferior e *i* é o intervalo de classe (0.5) (Arkin e Colton, 2).

Obtidos assim os valores modais dos diâmetros foram calculados os volumes das esferas correspondentes.

Para o estudo da relação entre volume nuclear e valor múltiplo do genoma, os valores modais das diferentes categorias de núcleos em cada espécie de ofídio foram diagramados no seguinte modo: nas abcissas os valores múltiplos do genoma e nas ordenadas os valores modais das curvas dos núcleos das diferentes fases espermatogenéticas. Assim foram consideradas como haploides (n = 1) as espermatídias, como diploides (n = 2) os espermatocitas de segunda ordem e as espermatogonias e como tetraploides (n = 4) os espermatocitas de primeira ordem e os profases goniais.

Neste diagrama foi calculada a equação de regressão (**) e com os respectivos valores teóricos para cada valor da abcissa foi calculado o "Erro de estimação" $\overline{Sy} = \sqrt{\frac{\Sigma D^2}{N - 2}}$ usando o valor N-2 devido ao pequeno número de valores incluidos no cálculo.

O erro de estimação é a medida que nos permite julgar da atendibilidade dos valores que se afastam dos valores teóricos da linha de regressão e de julgar, portanto, se os afastamentos devem ser considerados no limite dos desvios causais ou se pelo contrário êstes afastamentos são devidos a causas definidas, e portanto, revelarem uma significação específica.

---

(**)

$$y' = \overline{y} \frac{S\ (dx.\ dy)}{S\ dx2} . (\overline{x} - x)$$

## III) RESULTADOS

Reproduzimos aqui para cada espécie, o gráfico (A) dos histogramas das frequências dos diâmetros nucleares de cada estádio espermatogenético e o gráfico de correlação entre volume modal e valor múltiplo do genoma (B). Os valores das ordenadas do gráfico B, portanto, correspondem aos valores modais das curvas dos gráficos A.

Como já temos esclarecido foram considerados os espermatocitos de primeira ordem como tetraploides, aquêles de segunda ordem como diploides e as espermatídias como haploides. As espermatogônias teoricamente são diploides, porém, elas têm crescimento interfásico que as leva ao valor tetraploide da profase. Durante êste crescimento os núcleos variam de volume e, como será indicado mais adiante, a maioria dos espermatogonias têm um valor maior do que os diploides e está bem fastado do valor teórico diploide da linha de regressão. Êste valor é, porém, bem coincidente com o valor teórico triploide e em quase todos os diagramas B está bem coincidente com o ponto correspondente da linha de regressão e dentro do limite fiducial do Erro de estimação. Portanto, no cálculo da linha de regressão êstes valores dos volumes dos espermatogonias foram considerados efetivamente como pertencentes a abcissa 3n. A absoluta constância dêste fenômeno em tôdas as espécies examinadas nos leva a convicção de que êste valor tem uma real significação biológica que será considerada mais adiante.

Em alguns casos as espermatogonias têm uma curva de frequência nitidamente bimodal, sendo uma das modas, geralmente a maior no valor de 3n e a outra perfeitamente coincidente com a de 2n das espermatocitas de segunda ordem. Nestes casos todos os dois valores modais foram utilizados no cálculo da equação de regressão um como 2n e outro como 3n.

* * *

Foram estudados com êste método os testículos das seguintes cobras constantes do seguinte esquema, em ordem sistemática (Lista remissiva dos ophidios do Brasil, de Afranio do Amaral, 2.ª Ed., 1936 (1).

Fam. BOIDAE

sub-fam. *Boinae*

*Constrictor constrictor constrictor* L. (97)

Fam. COLUBRIDAE

sub-fam. *Colubrinae*
*Chironius carinatus* L. (87)
*Xenodon merremii* Wagler (19-65-77)

sub-fam. *Boiginae*
*Pseudoboa trigemina* D. et B. (17-21)
*Thamnodynastes (Dryophylax) pallidus pallidus* L. (27) (*)
*Tomodon dorsatus* D. et B. (68)
*Phylodryas olfersii* Lichtenstein (66)
*Phylodryas schotii* Schlegel (1-15)

Fam. CROTALIDAE.

sub-fam. *Lachesinae*
*Bothrops atrox* L. (84)
*Bothrops jararaca* Wied (47)

sub-fam. *Crotalinae*
*Crotalus terrificus terrificus* Laurenti (61)

* * *

Durante estas pesquisas foram examinados muitos mais exemplares dos que aqui estão apresentados; o número reduzido aqui se deve, além da dificuldade de encontrar machos em algumas espécies, ao ponto de termos escolhido somente aquêles nos quais os testículos se apresentavam mais favoráveis ao estudo pelo grau de maturidade. Alguns dos exemplares estudados são muito jovens justamente para o estudo das fases iniciais da espermatogênese em relação especialmente ao tamanho das espermatogonias. O número entre aspas e a indicação do protocole.

Damos aqui as indicações pormenorizadas dos casos estudados com os diagramas "A" dos histogramas dos volumes nucleares nas diferentes células testiculares e "B" o diagrama da correlação entre o volume nuclear (valor modal) de cada tipo de células testiculares e o número de cromosomas (valor múltiplo do genoma haploide correspondente).

* * *

(*) Esta especie é atualmente objeto de uma revisão sistematica na Secção de Ofiologia do Instituto Butantan. Portanto deve ser considerada como provisoria e poderá ser no futuro modificada.

Fam. BOIDAE

Sub-fam. *Boinae*

*Constrictor constrictor constrictor* L. (Prot. 97) Tab. I.

Indivíduo de 1 300 cm. Sacrificado no dia 28 de Maio de 1946. O testículo estava em maturação avançada.

Espermatogonias com poucas mitoses. Espermatocitas de 1a. ordem prevalentes nas fases iniciais (leptotenos). Raras as metafases 1as. O estádio dominante é o do espermatídio e o da espermiogênese. Raríssimos os espermatocitas de 2a. ordem.

Espermatozóides maduros no centro do canalículo, porém, sem lume vazio do canalículo.

O diagrama das frequências do volume nuclear, Fig. 2 A, é bastante regular para os espermatocitas de 1a. e 2a. ordens e as espermatídias. As espermatogônias têm um histograma bimodal.

O diagrama de correlação (Fig. 2 B) mostra uma perfeita coorrelação entre os valores modais e o valor múltiplo do genoma haploide. A segunda moda do histograma das espermatogônias coincide perfeitamente com o valor 3n e quando diagramado em abcissa 2n está num valor de ordenada bem além de 3 Sy (Diferença entre valor do espermatogônio 2n e 2a. moda é de 345 ; 3 Sy = 88.05).

TABELA I

*Constrictor constrictor constrictor* L. (97)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | 1 |
| 8.5 | | | | | 7 |
| 9 | | | | | 29 |
| 9.5 | | | | | 65 |
| 10 | 3 | | | 3 | 53 |
| 10.5 | 9 | | | 2 | 8 |
| 11 | 33 | | | 10 | 2 |
| 11.5 | 22 | | | 13 | |
| 12 | 17 | | | 20 | |
| 12.5 | 22 | | | 5 | |
| 13 | 57 | | 3 | 4 | |
| 13.5 | 55 | | 17 | 0 | |
| 14 | 34 | | 18 | 1 | |
| 14.5 | 18 | | 25 | | |
| 15 | 5 | 1 | 25 | | |
| 15.5 | 3 | | 11 | | |
| 16 | | | 10 | | |
| 16.5 | | 1 | 3 | | |
| 17 | | | | | |
| 17.5 | | | | | |
| 18 | | | | | |
| Modas | 795<br>1155 | — | 1596 | 808 | 452.5 |

$\bar{x} = 2.4$
$\bar{y} = 961.2$
$b' = 379.4$
$\overline{Sy} = 29.35$
$3\ Sy = 88.05$
$d = 345$

Neste exemplar não foi calculado o erro de estimação devido à irregularidade do histograma das espermatogônias acima mencionadas. Êste fato deve ser encarado como um sintoma de atividade reprodutiva das espermatogonias cuja porcentagem de mitose é de 12,7%.

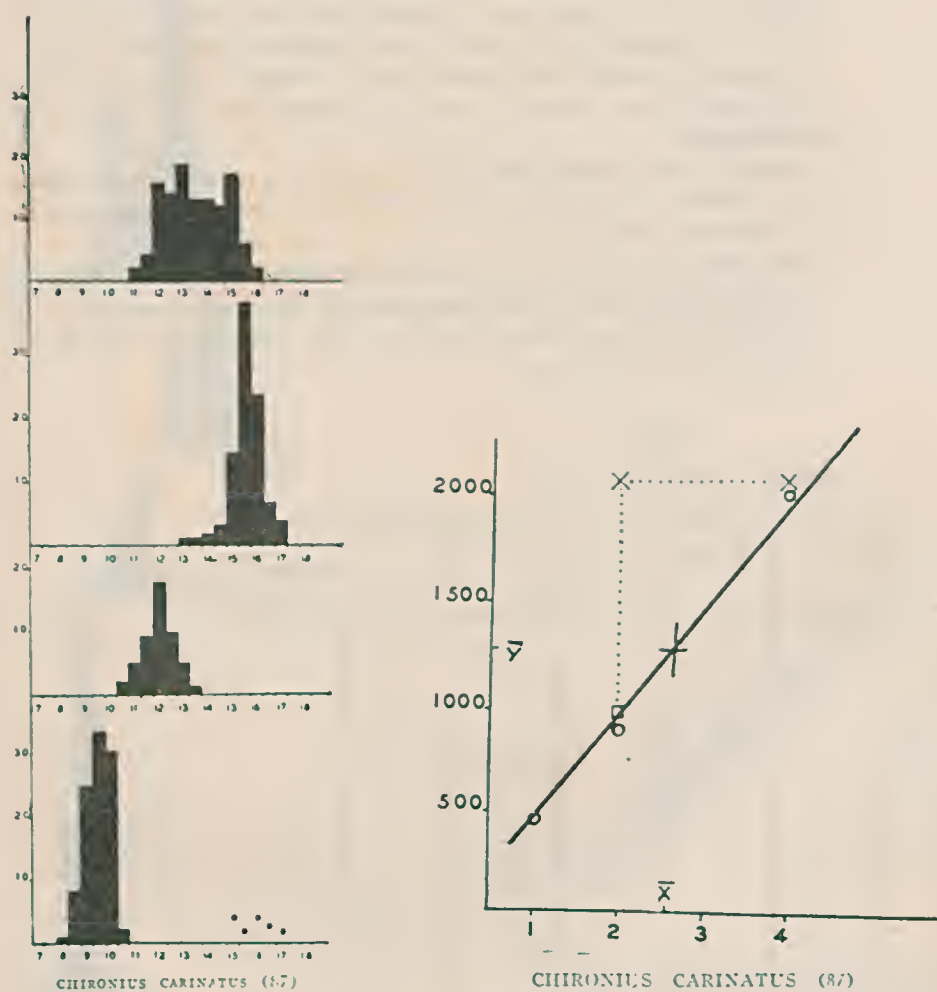



FIG. 3 A e B.

*Xenodon merremii* Wagler (Prot. 19) Tab. III.

Indivíduo de 82 centímetros. Capturado durante a copulação em 31 de agosto de 1945. Histologicamente o testículo é perfeitamente maduro. Canalículos com lume vazio contendo espermatozóides maduros e em maturação pegados à parede. Espermatogônias com escassas profases (3,2%). Espermatocitas de primeira ordem escassos em maioria paquitenos com algumas ilhas de metafases primeiras. A fase predominante é a de espermatídio e de espermiogênese.

A Fig. 4 indica uma grande regularidade dos histogramas dos volumes nucleares. Os espermatocitos de primeira ordem têm uma ligeira moda mais ou menos coincidente com aquella das gonias que porem poderia desaparecer com uma ampliação do intervalo de classe e, portanto, não deve ser tomado em consideração.

O diagrama da Fig. 4 B indica uma correlação bastante boa entre volume e cromosômios da série meiótica. O volume modal das espermatogônias como nos casos precedentes discorda com o valor diploide sendo aproximadamente concordante com o valor 3n. A diferença entre o valor teorico 2n e o valor real é ligeiramente inferior a 3 Sy, sendo, porém, superior a 2 Sy.

TABELA III

*Xenodon merremii* Wagler (19)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | |
| 8.5 | | | | | 7 |
| 9 | | | | | 33 |
| 9.5 | | | | 1 | 41 |
| 10 | | | | 0 | 35 |
| 10.5 | | | | 6 | 5 |
| 11 | 2 | | | 21 | |
| 11.5 | 5 | | | 32 | |
| 12 | 7 | | | 36 | |
| 12.5 | 13 | | | 14 | |
| 13 | 14 | | | 6 | |
| 13.5 | 17 | | | 1 | |
| 14 | 17 | 1 | 7 | | |
| 14.5 | 10 | | 4 | | |
| 15 | 4 | 1 | 10 | | |
| 15.5 | 4 | | 19 | | |
| 16 | 1 | | 18 | | |
| 16.5 | | | 12 | | |
| 17 | | 1 | 7 | | |
| 17.5 | | | 3 | | |
| 18 | | | 2 | | |
| 18.5 | | | 1 | | |
| Modas | 1283 | — | 2132 | 805 | 449 |

$\bar{x}$ = 2.5
$\bar{y}$ = 1168.5
b' = 523.2
$\overline{Sy}$ = 182.9
3 $\overline{Sy}$ = 548.7    2 $\overline{Sy}$ = 365
d = 381.6

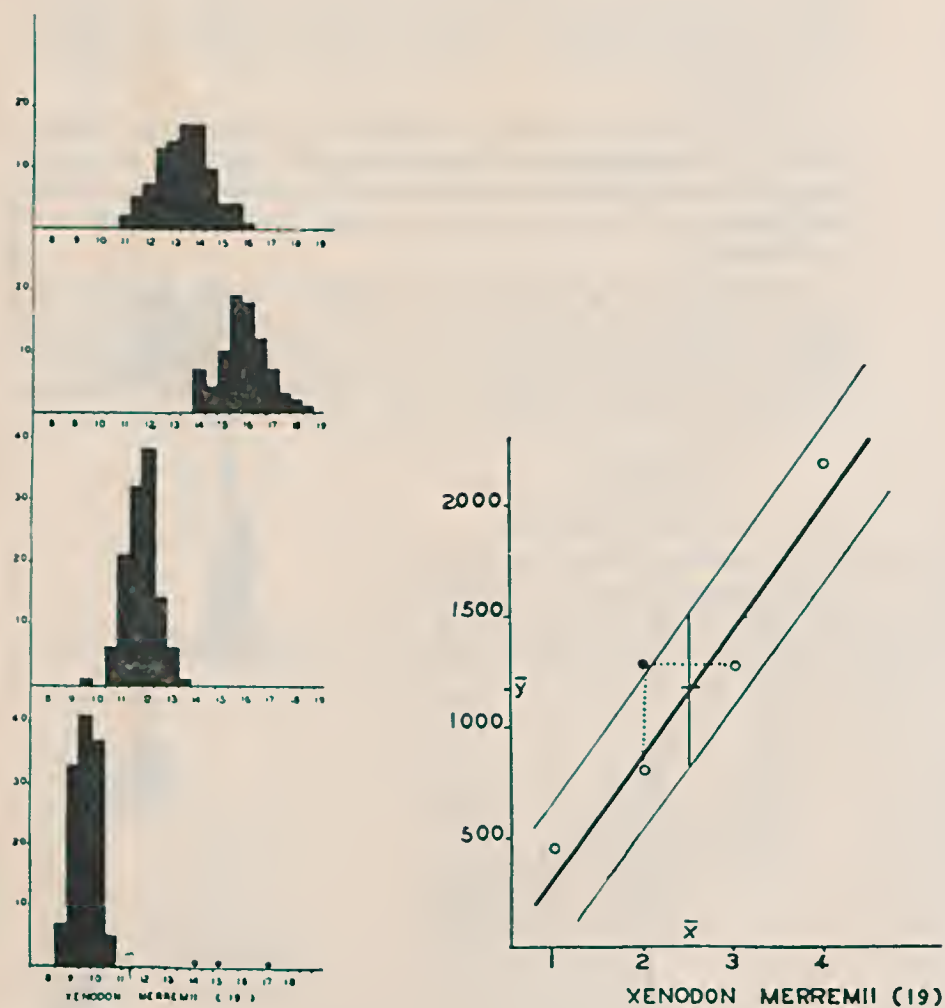



Fig. 4 A e B.

*Xenodon merremii* Wagler (Prot. 65) Tab. IV.

Indivíduo de 71 centímetros fixado em 26 de outubro de 1946. Testículo completamente maduro. Canalículos vazios com espermatozoides livres e muitos outros empilhados na parede. Fase predominante é a da espermatidia e a da espermiogênese.

Gônios com numerosíssimas mitoses (35% profases sôbre os gônios interfásicos medidos). Êste número, é porém, ligeiramente superior ao real por serem as profases escolhidas ao passo que as interfases são medidas ao acaso. Espermatocitas de primeira ordem relativamente escassos.

Os histogramas são regulares sendo aquêle dos espermatocitas de primeira ordem ligeiramente assimétrico nos valores altos.

O histograma das espermatogônias tem uma segunda moda na classe 15. Calculando o valor modal dêste histograma com intervalo 1 em lugar de 0,5 o valor modal aumenta (1475). Este valor coincide muito mais de perto com o valor 3n da equação de regressão do que aquêle calculado com intervalo 0,5. A êste fato se deve a diferença com o valor indicado na tabela do trabalho precedente de 1946, para o mesmo indivíduo.

O diagrama de correlação, Fig. 5 B revela uma perfeita correlação entre os valores meióticos e a diferença com o valor diploide do volume espermatogonial significante sendo o erro de estimação muito pequeno.

TABELA IV

*Xenodon merremii* Wagler (65)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | 6 |
| 8.5 | | | | | 25 |
| 9 | | | | | 34 |
| 9.5 | | | | | 25 |
| 10 | | | | 1 | 15 |
| 10.5 | | | | 5 | 3 |
| 11 | 5 | | | 9 | |
| 11.5 | 2 | | | 22 | |
| 12 | 7 | | | 47 | |
| 12.5 | 20 | | | 18 | |
| 13 | 36 | | | 13 | |
| 13.5 | 46 | | 1 | 5 | |
| 14 | 34 | | 2 | 1 | |
| 14.5 | 22 | 2 | 7 | | |
| 15 | 26 | 8 | 17 | | |
| 15.5 | 6 | 8 | 20 | | |
| 16 | 1 | 5 | 15 | | |
| 16.5 | 0 | 5 | 13 | | |
| 17 | 1 | 1 | 9 | | |
| 17.5 | | 0 | 5 | | |
| 18 | | 1 | 3 | | |
| Modas | 1475.5 | 1937 | 1953 | 904.7 | 383.7 |

$\bar{x} = 2.5$
$y = 117.9$
$b' = 527.87$
$Sy = 27.37$
$3\ Sy = 82.1$
$d = 560.24$

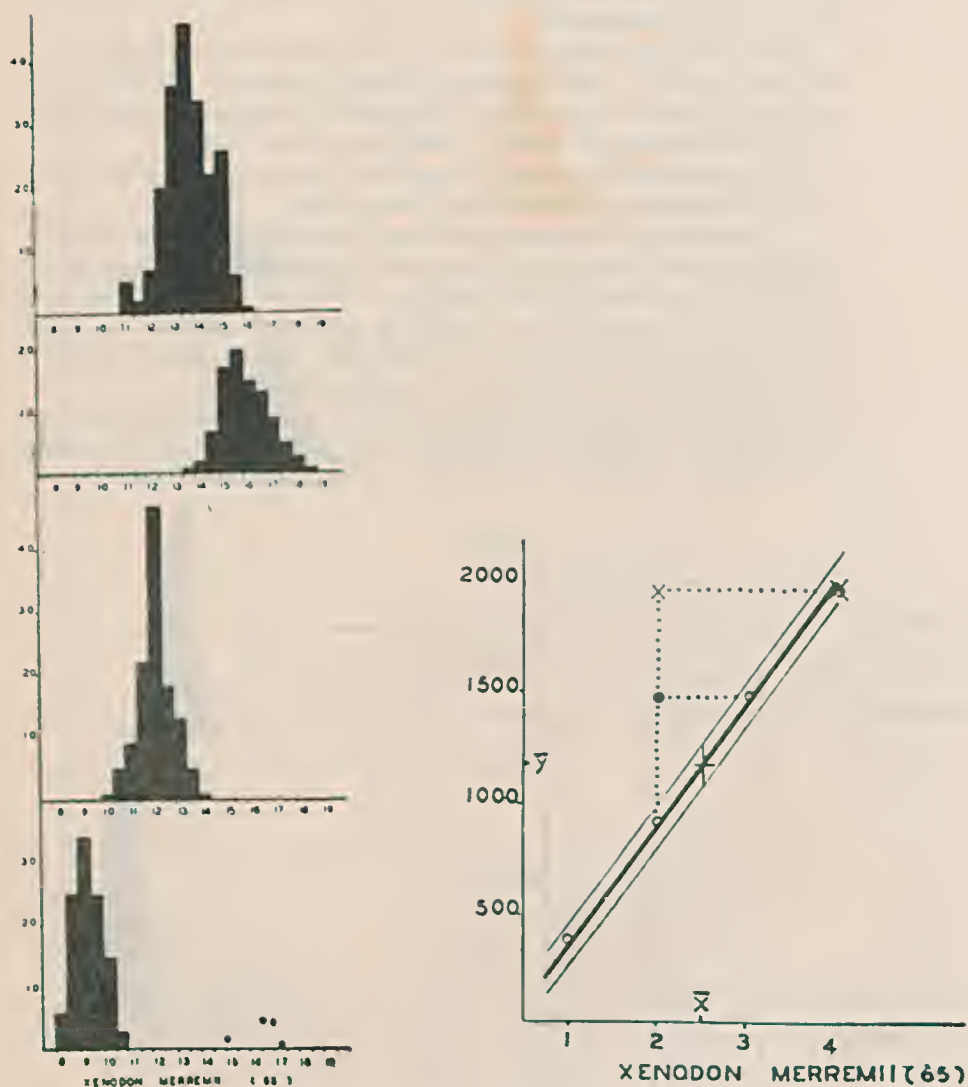



Fig. 5 A B

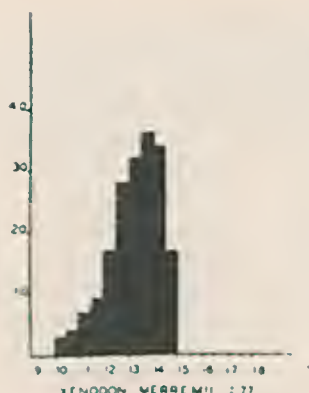



Fig. 6

*Xenodon merremii* Wagler (Prot. 77) Tab. V.

Indivíduo muito jovem, de 36 centímetros, fixado em 15 de janeiro de 1946. Testículos extremamente pequenos, não maduros com canalículos ao estádio de cordões epiteliais cheios de espermatogônias em repouso e raras profases e ainda mais raras as metafases goniais.

A Fig. 6 mostra os resultados das medidas dêstes espermatogônias que dão um histograma bastante regular, embora ligeiramente assimétrico nos valores baixos. O valor modal de 1287 é concordante com os dos dois indivíduos maduros previamente examinados.

Como será discutido mais adiante êste fato indica que êstes espermatogônias estão em atividades multiplicativas, embora fraca.

Além disso êste fato indica que as espermatogônias, nos indivíduos jovens antes da maturação sexual têm o mesmo valor nuclear dos espermatogônias dos indivíduos maturos e pelo menos entre estas idades não há gerações de gônias de volume diferente como se verifica, por exemplo, em outros vertebrados (Peixes).

Tabela V

*Xenodon merremii* Wagler (77)

| Diametro | Gonia |
|---|---|
| 10 | 3 |
| 10.5 | 4 |
| 11 | 7 |
| 11.5 | 9 |
| 12 | 17 |
| 12.5 | 28 |
| 13 | 32 |
| 13.5 | 36 |
| 14 | 34 |
| 14.5 | 17 |
| Modas | 1287 |

Sub-fam. *Boiginae*
*Pseudoboa trigemina* D. & B. (Prot. 17) Tab. VI

Indivíduo de 76 centímetros, fixado em 28 de Agosto de 1945. Histologicamente o testículo está em plena maturidade. Canalículos bem ocos com espermatozóides no lume e pegados às paredes.

Espermatogônias com 6.5% de profases. Espermatocitas de 1a. ordem, abundantes em tôdas as fases auxocitárias e frequentes as 1as. metafases.

Os histogramas dos esparmatocitas de 2a. ordem e das espermatídias são juntos devido ao grande número de espermatocitas de 2a. ordem. Isto dá um diagrama perfeitamente bimodal. Histograma das espermatogônias ligeiramente irregular. Com a perequação, porém, resulta nitidamente bimodal com o valor modal inferior correspondente à moda dos espermatocitas de segunda ordem e a outra intermediária entre 2a. e 1a. ordem (Fig. 7 A).

O diagrama de correlação (Fig. 7 B) dá uma linha de regressão na qual o valor da moda maior das espermatogônias é discordante com o valor diploide da abcissa, mas pelo contrário, coincide bastante bem com o valor 3n. A diferença é estatisticamente significante, pois a ordenada da segunda moda está bem fóra do limite de confiança de 3 Sy.

Tabela VI

*Pseudoboa trigemina* D. e B. (17)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II Ide. | |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | |
| 8.5 | | | | 16 | |
| 9 | | | | 43 | |
| 9.5 | | | | 26 | |
| 10 | 2 | | | 25 | |
| 10.5 | 2 | | | 9 | |
| 11 | 3 | | | 19 | |
| 11.5 | 10 | | | 21 | |
| 12 | 4 | | | 29 | |
| 12.5 | 8 | | | 10 | |
| 13 | 4 | | 1 | 6 | |
| 13.5 | 12 | | 1 | 0 | |
| 14 | 17 | | 3 | 0 | |
| 14.5 | 15 | | 10 | 1 | |
| 15 | 12 | 1 | 27 | 1 | |
| 15.5 | 3 | 0 | 14 | | |
| 16 | 1 | 4 | 15 | | |
| 16.5 | 0 | 1 | 12 | | |
| 17 | 1 | | 1 | | |
| 17.5 | | | 1 | | |
| 18 | | | 2 | | |
| 18.5 | | | | | |
| 19 | | | | | |
| Modas | 900.3<br>1544 | Média<br>2110 | 1942 | 441.8<br>845 | |

$\overline{x}$ = 2.4
$\overline{y}$ = 1134.6
b' = 522.5
$S_{\overline{y}}$ = 78.82
3 $S_{\overline{y}}$ = 236.46
d = 346

Um segundo exemplar desta espécie será examinado num trabalho sucessivo por ter um quadro cariométrico diferente e indica a existência de uma terceira divisão com um intervalo entre espermatocita de 1a. ordem e espermatídia de 8:1. Êste exemplar apresenta além disso uma dimegalia em tôdas as fases da espermiogênese. que falta no indivíduo 17 (Schreiber 1946:50).

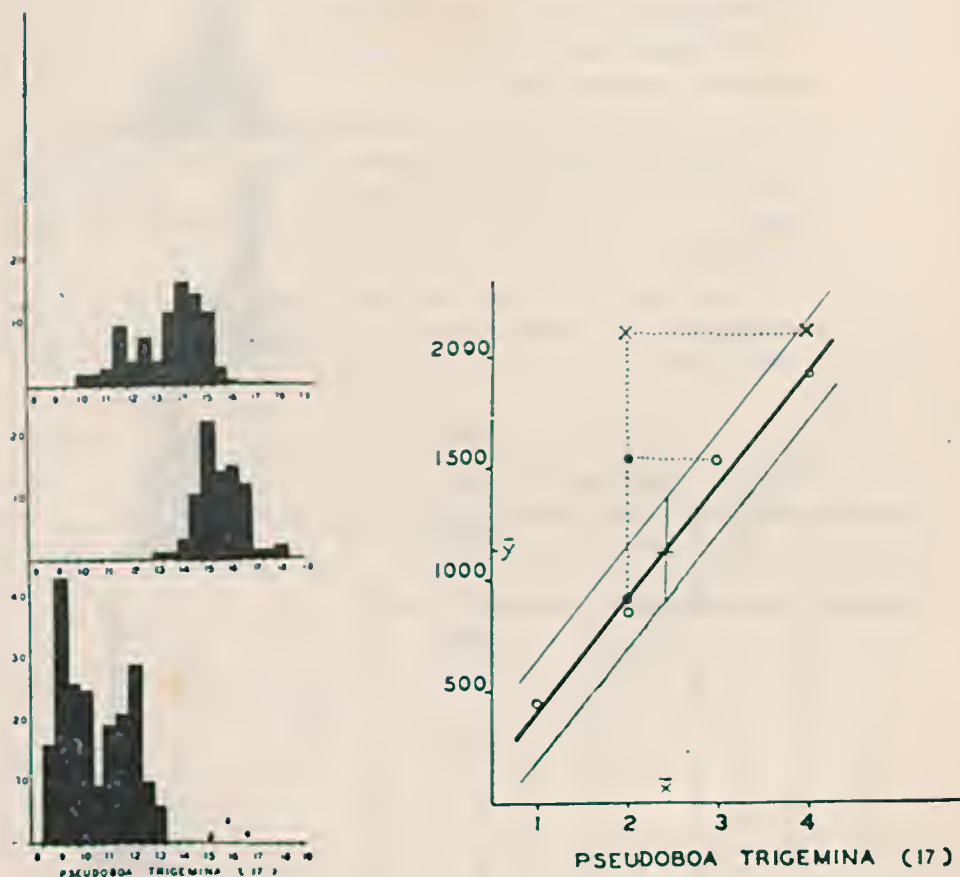



Fig. 7 A e B

*Dryophylax pallidus* L. (Prot. 27) Tab. VII.

Indivíduo de 26 centímetros fixado em 5 de setembro de 1945. Histologicamente o testículo é imaturo. Os túbulos têm lume oco, porém, sem espermatozóides formados e as fases espermioistogenéticas são totalmente ausentes.

A fase fundamental predominante é a do espermatocita de 1a. ordem, sendo frequentes os canalículos cuja parede é formada por uma camada de espermatogônias e muitas camadas de auxocitas em tôdas as fases. Poucos espermatocitas de 2a. ordem e espermatides.

Praticamente ausentes as mitoses espermatogoniais, faltando, portanto, as medidas das profases relativas.

Os histogramas (Fig. 8 A.) são muito regulares na série meiótica, ao passo que as espermatogônias têm um histograma "impuro" com prováveis modas encobertas. A moda está como nos demais casos entre a moda dos espermatocitas de 1a. e 2a. ordem. A moda encoberta tem provavelmente o valor correspondente a 2n.

O diagrama de correlação (Fig. 8 B) é muito nitido e o valor modal espermatogonial bem coincidente com o de 3n e a diferença com o de 2n fortemnte evidente.

TABELA VII

*Dryophylax palidus pallidus* L. (27)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 9 | | | | | 14 |
| 9.5 | | | | | 19 |
| 10 | 3 | | | 1 | 45 |
| 10.5 | 0 | | | 1 | 18 |
| 11 | 5 | | | 9 | 13 |
| 11.5 | 9 | | | 16 | 3 |
| 12 | 12 | | | 27 | 1 |
| 12.5 | 12 | | | 27 | |
| 13 | 13 | | 1 | 23 | |
| 13.5 | 28 | | 0 | 11 | |
| 14 | 20 | | 9 | 4 | |
| 14.5 | 26 | | 13 | 3 | |
| 15 | 16 | | 31 | 3 | |
| 15.5 | 7 | | 31 | | |
| 16 | 9 | | 14 | | |
| 16.5 | 3 | | 4 | | |
| 17 | 1 | | 1 | | |
| 17.5 | | | | | |
| Modas | 1436.5 | — | 1931 | 949.8 | 522 |

$\bar{x}$ = 2.5
$\bar{y}$ = 1204.8
b' = 471.37
$\overline{Sy}$ = 27.26
3 $\overline{Sy}$ = 71.78
d = 465.3

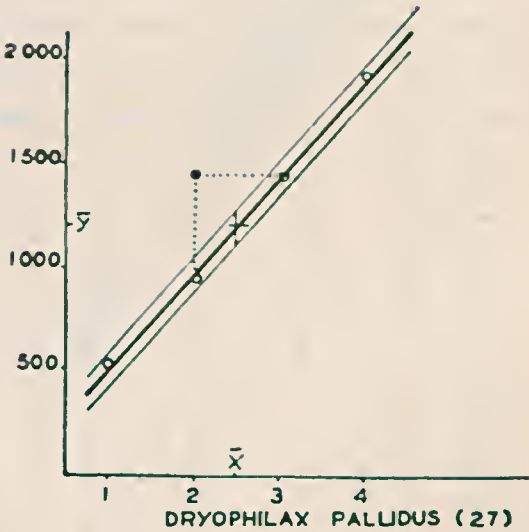
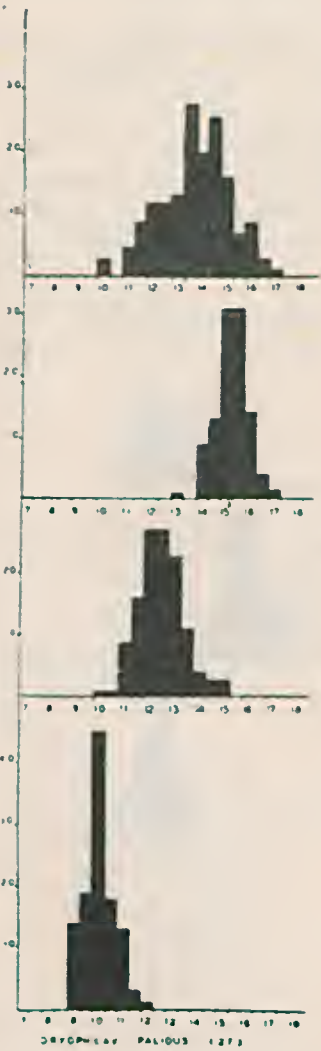



Fig. 8 A e B

## *Tomodon dorsatus* D. & B. (Prot. 68) Tab. VIII.

Indivíduo de 45 centímetros fixado em 14 de novembro de 1945. Testículo imaturo. Canalículos com lume oco, às vêzes, porém, frequentemente cheios de espermatídias. Falta quase total de espermatozóides e fases histogenéticas.

A parede dos canalículos é geralmente constituida por camadas de auxocitas nas diferentes fases da profase meiótica com maior incidência dos leptotenos.

O histograma da (Fig. 9 A) é um dos mais demonstrativos entre todos os que tivemos até agora. As espermatogônias têm uma curva perfeitamente bimodal com as duas modas respectivamente coincidentes com os valores de abcissa de 2n e 3n. As fases meióticas têm curvas perfeitamente limpas e regulares.

O diagrama de correlação (Fig. 9 B) confirma perfeitamente o valor 3n da moda maior espermatogonial com uma diferença com o valor 2n perfeitamente significante.

TABELA VIII

*Tomodon dorsatus* D. e B. (68)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | |
| 8.5 | | | | | 1 |
| 9 | | | | | 0 |
| 9.5 | | | | | 8 |
| 10 | | | | | 22 |
| 10.5 | | | | | 24 |
| 11 | 1 | | | | 10 |
| 11.5 | 5 | | | 4 | 1 |
| 12 | 11 | | | 8 | |
| 12.5 | 12 | | | 15 | |
| 13 | 19 | | | 23 | |
| 13.5 | 13 | | | 12 | |
| 14 | 12 | | | 7 | |
| 14.5 | 9 | | | | |
| 15 | 17 | | | | |
| 15.5 | 13 | | 7 | | |
| 16 | 8 | | 14 | | |
| 16.5 | 1 | | 0 | | |
| 17 | 4 | | 12 | | |
| 17.5 | 0 | | 3 | | |
| 18 | 0 | | 4 | | |
| 18.5 | 1 | | 2 | | |
| Modas | 1147<br>1765 | | 2286 | 1071 | 5889 |

$\bar{x} = 2.4$
$\bar{y} = 1371.6$
$b' = 575.2$
$\bar{S}y = 51.4$
$3\,\bar{S}y = 154.2$
$d = 623.5$

Devemos salientar aqui uma consideração interessante: se confrontarmos os valores *absolutos* dos volumes das síngulas fases da espermatogênese desta espécie, com as correspondentes das demais espécies examinadas, podemos constatar que pelo menos êste exemplar de *Tomodon dorsatus*, tem células bem maiores do que os outros ofídios. Um primeiro ensaio estatístico sôbre êste fenômeno nos indicou o seguinte: o tamanho nuclear do *Tomodon* em exame é sempre em todos os estádios maior do que $M + 3\sigma$, sendo M a média aritmética de todos os valores do mesmo estádio das demais espécies examinadas.

Limitamo-nos a apontar êste fato na espera de que medidas extensivas sôbre um grande número de espécies possam dar maior esclarecimento e eventual significação sistemática a êste fenômeno.

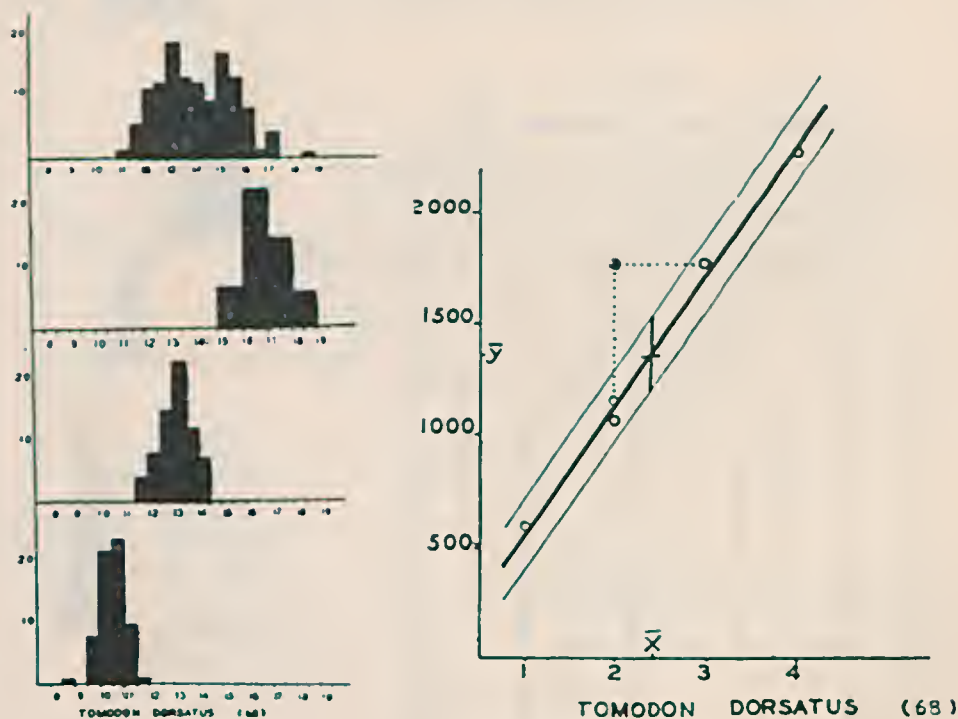



Fig 9 A e B.

### *Philodryas olfersii* Lichtenstein (Prot. 66) Tab. IX.

Indivíduos de 88 centímetros, fixado em 31 de outubro de 1945. Canalículos cheios de espermatozóides e fases de espermiogênese que constituem a fase mais abundante.

Espermatocitas de primeira ordem raras. Algumas profases goniais.

O histograma da Fig. 10 A é bem regular para as fórmas meióticas, ao passo que a curva das espermatogônias está fortemente assimétrica para os valores menores o que provavelmente indica u'a moda encoberta aos valores diploides.

O diagrama de correlação reflete esta diferença pois os limites fiduciais do erro de estimação são bastante grandes e o valor modal das espermatogônias está no limite de 3 Sy, sendo, porém, bem fóra do valor 2 Sy tomado por vários autores como limite fiducial. O volume das profases goniais está dentro do limite fiducial do volume de 4 n.

TABELA IX

*Phylodrias olfersii* (Lichtenstein) (66)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | 4 |
| 8.5 | | | | | 13 |
| 9 | | | | | 38 |
| 9.5 | | | | | 27 |
| 10 | 1 | | | 1 | 15 |
| 10.5 | 6 | | | 3 | |
| 11 | 9 | | | 14 | |
| 11.5 | 13 | | | 16 | |
| 12 | 19 | | | 3 | |
| 12.5 | 21 | | | | |
| 13 | 22 | | | | |
| 13.5 | 8 | 1 | 2 | | |
| 14 | 8 | 4 | 11 | | |
| 14.5 | 1 | 1 | 23 | | |
| 15 | | 1 | 30 | | |
| 15.5 | | 0 | 15 | | |
| 16 | | 1 | 15 | | |
| 16.5 | | | 4 | | |
| 17 | | | 1 | | |
| 17.5 | | | | | |
| Modas | 1122 | Média 1504 | 1750 | 767 | 406 |

$\overline{x} = 2.5$
$\overline{y} = 1010$
$b' = 472.5$
$\overline{Sy} = 117.2$
$3\,\overline{Sy} = 351.6$ $2\,\overline{Sy} = 238.1$
$d = 348.25$

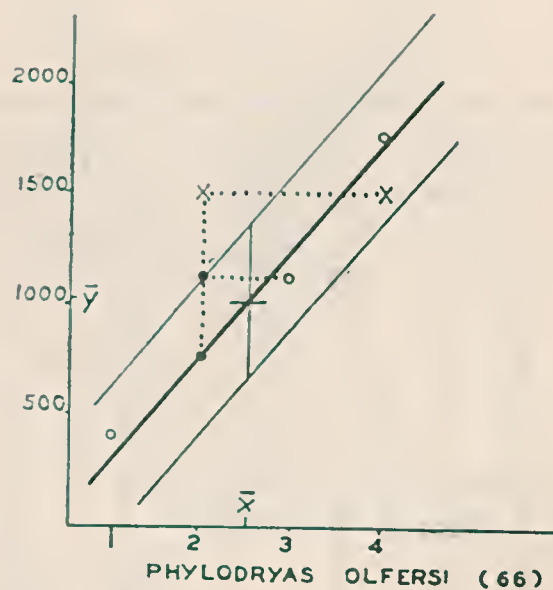
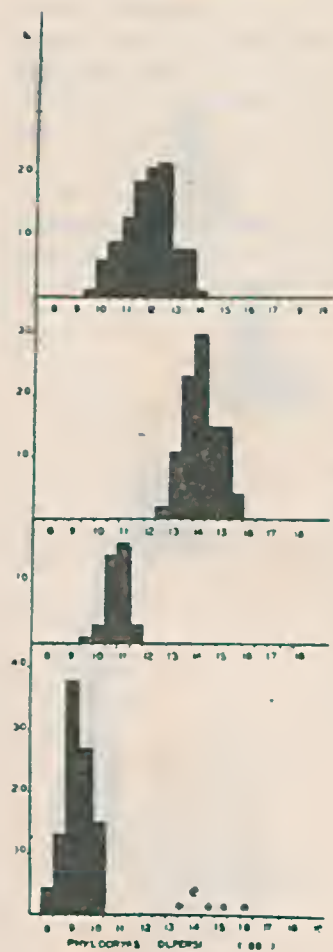



Fig. 10 A e B.

*Philodryas schottii* Schlegel (Prot. 1) Tab. X.

Indivíduo de 139 centímetros fixado em 7 de Agosto de 1945. Testiculo em perfeita maturação histológica. Canalículos ocos com espermatozóides pegados às paredes e tôdas as fases da espermiogênese.

Abundantes os auxocitas em tôdas as fases de crescimento e notável abundância de metafases 1.as. Raríssimas as profases espermatogoniais.

É característico dêste individuo o fenômeno que se apresenta seja nos espermatocitas de 1.a ordem e 2.a ordem e espermatídias, de estar reunidos em grupos de 4-8 núcleos evidentemente derivados de um mesmo espermatogônia. Êste fato é localizado em certos canaliculos faltando em outros, e foi por nós verificado em seguida em outros exemplares também e de outras espécies no testículo ao fim do período maturativo.

Os histogramas são bastante regulares (Fig. 11) e a correlação entre volume e cromosômio boa, embora não tanto perfeita como nos casos precedentemente examinados. A moda dos espermatogônias correspondente aproximadamente ao valor de 3n, porém, a diferença com o valor de 2n é menor do que de 3 Sy.

Tabela X

*Phylodrias schottii* (Schlegel) 1.

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | | | | | |
| 7.5 | | | | | 13 |
| 8 | | | | | 37 |
| 8.5 | | | | | 39 |
| 9 | | | | | 47 |
| 9.5 | | | | | 18 |
| 10 | 2 | | | 4 | 4 |
| 10.5 | 3 | | | 15 | |
| 11 | 5 | | | 15 | |
| 11.5 | 8 | | | 14 | |
| 12 | 20 | | | 12 | |
| 12.5 | 20 | | 1 | 6 | |
| 13 | 13 | | 2 | 3 | |
| 13.5 | 9 | | 5 | | |
| 14 | 0 | | 9 | | |
| 14.5 | 1 | | 20 | | |
| 15 | 0 | | 20 | | |
| 15.5 | 1 | | 12 | | |
| 16 | | | 10 | | |
| 16.5 | | | 3 | | |
| 17 | | | 5 | | |
| 17.5 | | | 1 | | |
| 18 | | | | | |
| 18.5 | | | | | |
| Modas | 1018 | -- | 1760 | 700.7 | 323.8 |

$\overline{x} = 2.5$
$\overline{y} = 950.8$
$b' = 462.5$
$\overline{Sy} = 141.6$
$2\,\overline{Sy} = 285.2$
$3\,\overline{Sy} = 424.8$
$d = 298.5$

PHYLODRYAS SCHOTTII (I)

2000
1500
1000
500
ȳ
x̄
1
2
3
4
PHYLODRYAS SCHOTTII (I)

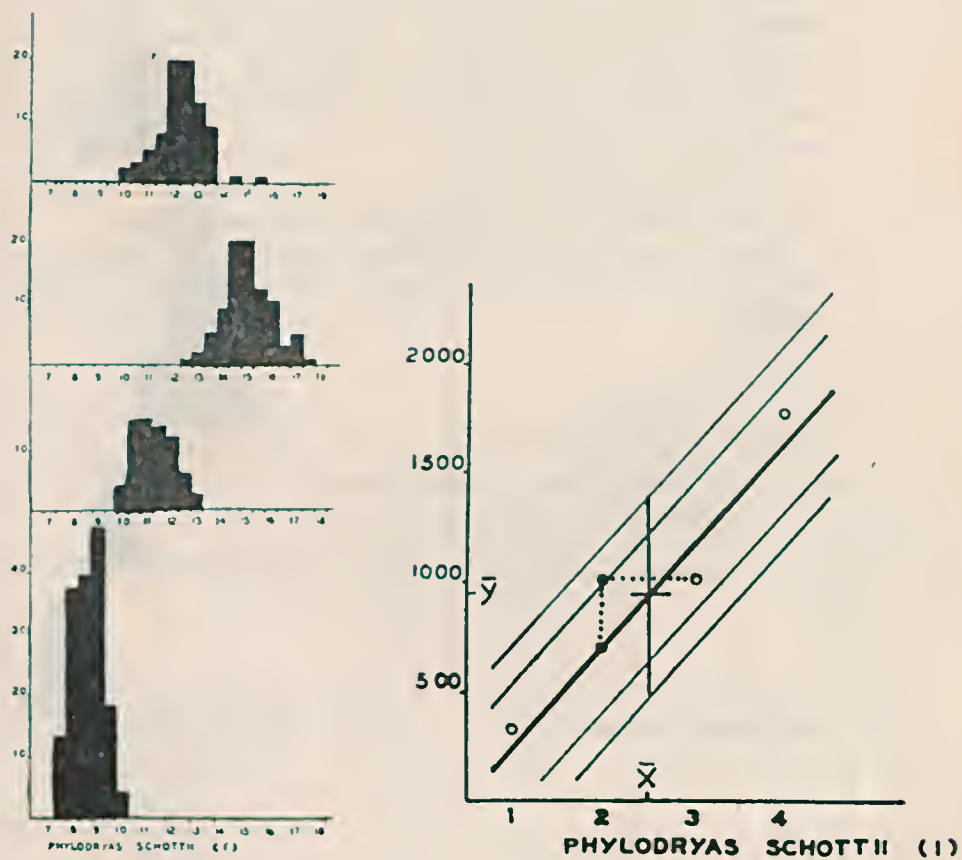



Fig. 11 A e B

*Philodryas schottii* Schlegel (Prot. 15) Tab. XI.

O segundo exemplar desta espécie foi capturado no momento da cópula e fixado em 27 de Agosto de 1945. Comprimento 102 centímetros.

O testículo é histologicamente maduro, provavelmente já na fase final do período reprodutivo. Canalículos com espermatozóides livres no lume, além das fórmas de evolução espermiogenéticas. A parede dos canalículos apresenta lacunas e são abundantes os espermatocitas de primeira ordem em tôdas as fases auxocitárias. Espermatogônias com poucas profases (5%). A fase predominante é a da espermiogênese e nestas fases existem, embora raras, fórmas de dimegalia, isto é, elementos de tamanho duplo do normal em tôdas as fases de histogênese do espermatozóide. Êste fenômeno, que já tivemos ocasião de descrever na espécie *Pseudoboa trigemina* será mais pormenorizadamente descrita em trabalho sucessivo.

Algumas fórmas de espermatídia em via de transformação em espermatozóide dão a impressão de ser devidas à fusão de dois espermatídias.

Neste exemplar se encontram também pequenos cistos formados por 2-4-8 núcleos na mesma fase de evolução (Espermatocitos I, II ou espermatídias).

TABELA XI

*Phylodrias schottii* (Schlegel) (15)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | | | | | |
| 7.5 | | | | | 5 |
| 8 | | | | | 3 |
| 8.5 | | | | | 14 |
| 9 | | | | | 18 |
| 9.5 | | | | | 11 |
| 10 | 2 | | | 2 | 2 |
| 10.5 | 5 | | | 9 | |
| 11 | 10 | | | 14 | |
| 11.5 | 15 | | | 14 | |
| 12 | 18 | | 2 | 7 | |
| 12.5 | 19 | | 11 | 4 | |
| 13 | 17 | 2 | 12 | | |
| 13.5 | 10 | 1 | 24 | | |
| 14 | 3 | 0 | 37 | | |
| 14.5 | 3 | 0 | 31 | | |
| 15 | 1 | 1 | 38 | | |
| 15.5 | 1 | 1 | 24 | | |
| 16 | | | 18 | | |
| 16.5 | | | 7 | | |
| 17 | | | 2 | | |
| Modas | 1018 | Média 1459.5 | 1597 | 704.5 | 379.8 |

$\overline{x} = 2.5$
$\overline{y} = 924.8$
$b' = 396.5$
$\overline{Sy} = 100.2$
$3\,\overline{Sy} = 300.6$
$d = 292$

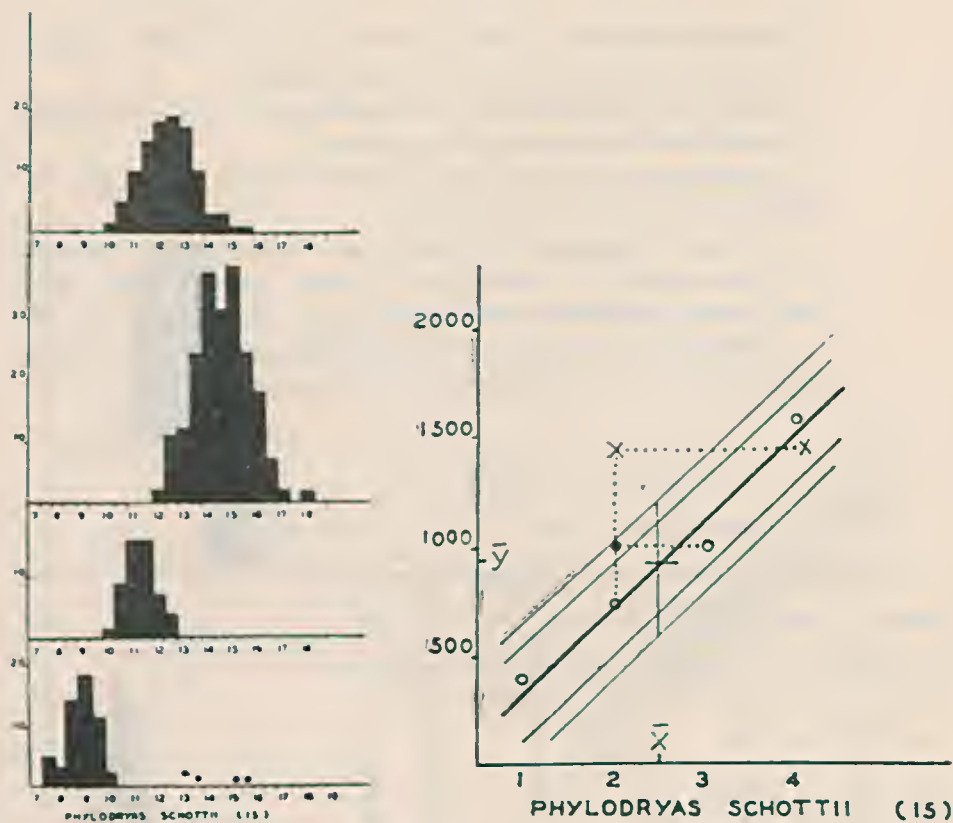



Fig 12 A e B

As curvas de frequência dos volumes nucleares são bastante regulares, sendo como em tôdas as outras espécies a correlação perfeita entre os valores da série meiótica. As espermatogônias têm um valor modal ao redor do volume correspondente a 3n, ao limite do valor fiducial de 3 Sy (diferença 292; 3 Sy = 300,6).

Os volumes das profases, embora com as reservas já feitas pelos demais casos concordam com o volume tetraploide.

Fam. CROTALIDAE

Sub-fam. *Lachesinae*

*Bothrops (Trimerisurus) atrox* L. (Prot. 84) Tab. XII.

Indivíduo pertencente à coleção do Instituto sob o No. 10655, fixado em 21 de março de 1946, com 89 centímetros de comprimento.

Testículos em plena maturação. Fase predominante é a de espermiogênese e a de espermatozóide maduro livre no canalículo.

Espermatocitos de 1.ª ordem escassos prevalentemente em leptoteno. Espermatogônias com raras profases (3,2%).

As curvas de frequência (Fig. 13 A) são regulares para os meiocitos. A das espermatogônias se apresenta mais irregular, porém, com dois valores modais bastante coincidentes respectivamente com os volumes de 2n e de 3n.

O diagrama de correlação confirma perfeitamente êste fato com valores bem significantes. As profases goniais são nitidamente tetraploides.

TABELA XII

*Bothrops atrox* L. (84)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | | | | | |
| 7.5 | | | | | 1 |
| 8 | | | | | 3 |
| 8.5 | | | | | 11 |
| 9 | | | | | 24 |
| 9.5 | 5 | | | | 20 |
| 10 | 27 | | | 2 | 6 |
| 10.5 | 31 | | | 4 | |
| 11 | 21 | | | 5 | |
| 11.5 | 31 | | 1 | 2 | |
| 12 | 30 | | 1 | 1 | |
| 12.5 | 32 | | 3 | | |
| 13 | 21 | 2 | 8 | | |
| 13.5 | 10 | 3 | 11 | | |
| 14 | 8 | 2 | 13 | | |
| 14.5 | 3 | 1 | 1 | | |
| 15 | 2 | | 2 | | |
| 15.5 | | | | | |
| 16 | | | | | |
| Modas | 697<br>905 | 1288 | 1279 | 662.9 | 306.4 |

$\overline{x} = 2.4$

$\overline{y} = 770.6$

$b' = 310.6$

$\overline{Sy} = 46.5$

$3\,\overline{Sy} = 139.5$

$d = 259$

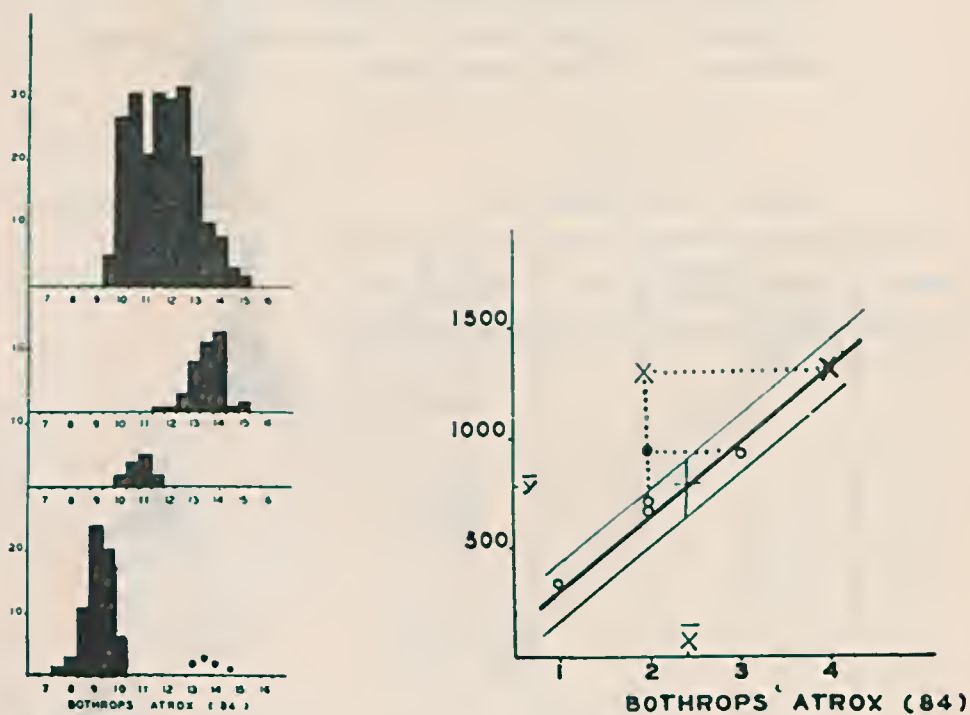



Fig. 13 A e B

*Bothrops jararaca* Wied (Prot. 47) Tab. XIII.

Indivíduo de 97 centímetros fixado em 18 de setembro de 1945. Testículo não perfeitamente maduro. Túbulos com lume amplo, mas ainda sem espermatozóides. Raras as fórmas histogenéticas. Raras mitoses goniais e a fase predominante é a de espermatocita de 1.ª ordem em tôdas as fases de crescimento auxocitário.

Histogramas muito regulares nas fórmas meióticas; gonias um pouco menos regulares com uma ligeira tendência a u'a moda na classe 12 correspondente a 2n. A moda principal coincide perfeitamente com o valor de 3n.

Diagrama de correlação indica com grande evidência a situação 3n da espermatogônia e de 4n das profases goniais.

TABELA XIII

*Bothrops jararaca* (Wied) (47)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | | | | 5 |
| 8.5 | | | | | 8 |
| 9 | | | | | 20 |
| 9.5 | | | | | 30 |
| 10 | 1 | | | 2 | 6 |
| 10.5 | 3 | | | 4 | |
| 11 | 5 | | | 14 | |
| 11.5 | 9 | | | 13 | |
| 12 | 17 | | | 13 | |
| 12.5 | 16 | | | 9 | |
| 13 | 31 | | | 4 | |
| 13.5 | 27 | | | | |
| 14 | 40 | | 9 | | |
| 14.5 | 26 | | 14 | | |
| 15 | 14 | | 23 | | |
| 15.5 | 0 | 1 | 27 | | |
| 16 | 3 | 1 | 12 | | |
| 16.5 | 0 | | 6 | | |
| 17 | 0 | | 3 | | |
| 17.5 | 1 | | 2 | | |
| 18 | | | | | |
| 18.5 | | | | | |
| 19 | | | | | |
| Modas | 1294 | Média 2047 | 1731 | 851.5 | 390 |

$\bar{x} = 2.5$

$\bar{y} = 1079$

$b' = 460.16$

$\overline{Sy} = 15.38$

$3\ \overline{Sy} = 46.14$

$d = 445$

BOTHROPS JARARACA (47)

2000
1500
1000
500
BOTHROPS JARARACA (47)

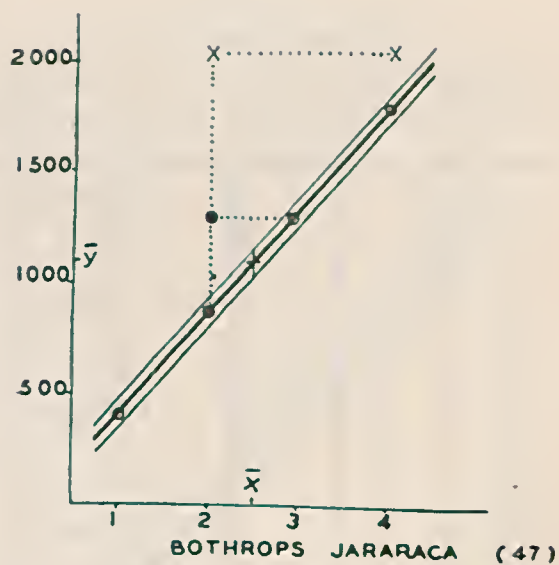
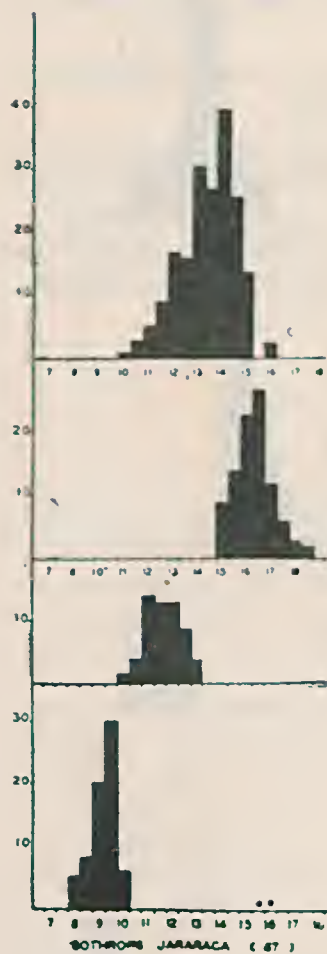



FIG. 14 A e B

Sub-fam. *Crotalinae*

*Crotalus terrificus* L. (Prot. 61) Tab. XIV.

Indivíduo de 104 centímetros fixado em 15.10.45. Testículo não perfeitamente maduro. Isto confirma tudo quanto já foi observado nas outras espécies de Crotalidae que a maturidade sexual se dá mais tarde do que nas Colubridae.

Fase predominante é a de espermatocita de 1.ª ordem. Abundantes as espermatogônias, porém, com poucas mitoses (3,5%).

Histogramas muito regulares e o diagrama de correlação (Fig. 15) indica perfeitamente a situação 3n da moda espermatogonial. Profases goniais perfeitamente coincidentes com o valor de 4n.

Uma ligeira extensão do histograma das espermatogonias na região das classes baixas indica provavelmente u'a moda encoberta aos valores diploides.

TABELA XIV

*Crotalus terrificus* L. (61)

| Diametro | Gonia | Profase gonia | Cit. I | Cit. II | Ide. |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | | | | | 12 |
| 7.5 | | | | | 31 |
| 8 | | | | 2 | 52 |
| 8.5 | | | | 14 | 41 |
| 9 | | | | 14 | 10 |
| 9.5 | | | | 22 | 4 |
| 10 | 2 | | | 10 | |
| 10.5 | 1 | | | 14 | |
| 11 | 8 | | | 4 | |
| 11.5 | 8 | | | 1 | |
| 12 | 12 | | | | |
| 12.5 | 13 | | | | |
| 13 | 40 | | | | |
| 13.5 | 44 | | | | |
| 14 | 36 | | 3 | | |
| 14.5 | 13 | | 26 | | |
| 15 | 9 | 4 | 47 | | |
| 15.5 | 5 | 2 | 36 | | |
| 16 | 4 | 0 | 24 | | |
| 16.5 | | 1 | 14 | | |
| 17 | | | 8 | | |
| 17.5 | | | 0 | | |
| 18 | | | 1 | | |
| 18.5 | | | 1 | | |
| 19 | | | 1 | | |
| Modas | 1270 | 1900 | 1785 | 782 | 386 |

$\bar{x} = 2.5$
$\bar{y} = 1055$
$b' = 456.8$
$\bar{Sy} = 56.24$
$3\,\bar{Sy} = 168.72$
$d = 443.6$

CROTALUS TERRIFICUS TERRIFICUS (61)

2000
1500
1000
500
1
2
3
4
CROTALUS TERRIFICUS (61

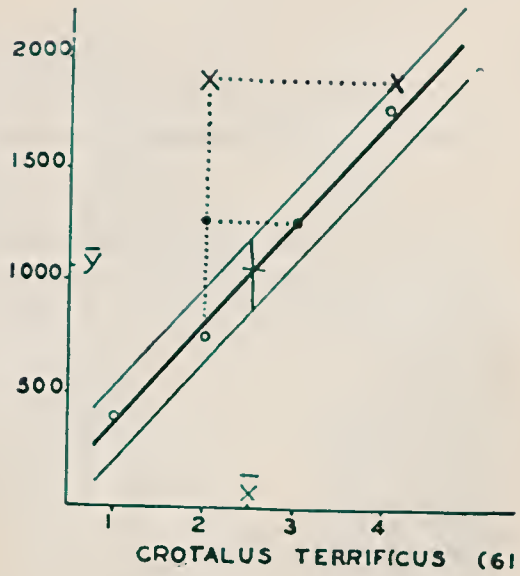
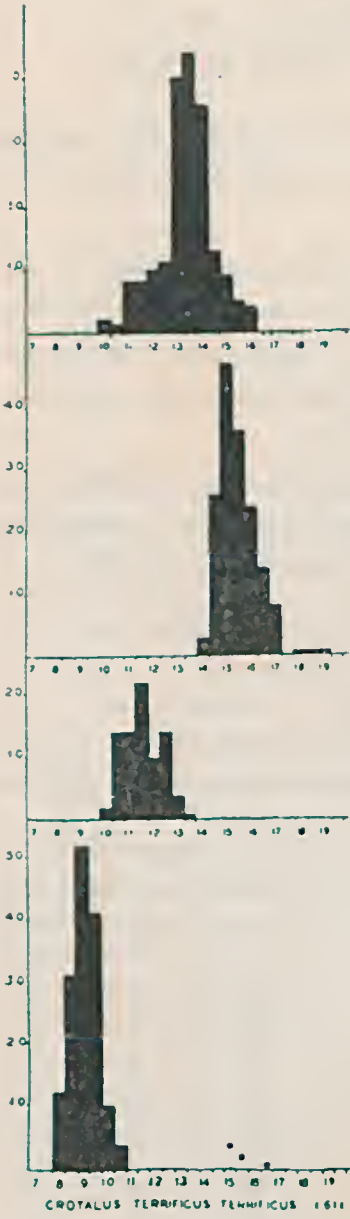



Fig. 15 A e B

## IV) DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### a) *Relação entre volume nuclear e valor múltiplo do genoma*

Em todos os casos estudados, como resulta evidente do exame dos diagramas de correlação, existe uma estrita correlação entre o volume nuclear e o número de cromosômios.

Êste fato se manifesta bem nitidamente na presente pesquisa devido ao fato de ter considerado como valor volumétrico o valor modal das curvas de frequência dos volumes nucleares. Discutiremos mais adiante a significação definitiva que êste valor modal tem no estudo do crescimento interfásico. Aqui queremos agora salientar as conclusões imediatas desta pesquisa.

Os espermatocitas de 1.ª ordem, os de 2.ª ordem e as espermatídias, têm os volumes nucleares respectivamente na relação de 4:2:1, isto é, exatamente na mesma relação em que se encontram os respectivos genomas como múltiplos do genoma haploide.

TABELA XV

*Volume nuclear (valor modal) dos estádios espermatogenéticos*

| Espécie | Espermatidias | Esp. cit II | Espermatogonias | | | Esp. cit I |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2n | (3n) | Prof. 4n | |
| Constrictor constrictor constrictor 97 | 452 | 808 | 795 | 1155 | — | 1568 |
| Herpetodryas carinatus 87 ...... | 449 | 904 | — | — | 2082 | 2027 |
| Xenodon merremii 19 .......... | 449 | 805 | — | 1288 | — | 2132 |
| Xenodon merremii 65 .......... | 383 | 904 | — | 1475 | — | 1953 |
| Xenodon merremi 77 .......... | — | — | — | 1287 | — | — |
| Pseudoboa trigemina 17 ...... | 442 | 845 | 900 | 1544 | 2110 | 1942 |
| Dryophylax pallidus 27 ...... | 522 | 950 | — | 1436 | — | 1931 |
| Tomodon dorsatus 68 .......... | 589 | 1071 | 1147 | 1765 | — | 2286 |
| Phyllodryas olfersi 66 ......... | 406 | 763 | — | 1122 | 1504 | 1750 |
| Phyllodrias schottii I. .......... | 324 | 701 | — | 1018 | — | 1760 |
| Phyllodryas schottii 15 ....... | 380 | 705 | — | 1018 | 1460 | 1597 |
| Bothrops atrox 84 ........... | 306 | 663 | 697 | 905 | 1288 | 1279 |
| Bothrops jararaca 47 ......... | 390 | 852 | — | 1294 | 2047 | 1781 |
| Crotalus terrificus 61 ......... | 386 | 782 | — | 1270 | 1900 | 1785 |
| Médias .............. | 414 | 825 | 884 | 1271 | 1765 | 1824 |

TABELA XVI

*Relação entre volumes nucleares (média entre os valores modais de 11 espécies com 14 indivíduos) e genoma*

| Células | Volume | Genoma n | Relação Vol./genoma | Vol. × n / Vol. n | Relação teórica |
|---|---|---|---|---|---|
| Espermatide .............. | 414 | n | 4.14 | 1 | 1 |
| Esp. cita II ............ | 825 | 2n | 4.1 | 1.99 | 2 |
| Esp. gonia ............... | 884 | 2n | 4.4 | 2.14 | 2 |
| Esp. gonia .. ........... | 1271 | (3n) | 4.23 | 3.08 | 3 |
| Profase gonia ............ | 1765 | 4n | 4.4 | 4.26 | 4 |
| Esp. cita I ............... | 1824 | 4n | 4.55 | 4.4 | 4 |

A Tabela XV resume todos os dados dos volumes modais e desta Tabela foi calculado o valor médio dêstes volumes para cada estádio espermatogenético no conjunto das espécies estudadas.

Como pode-se ver nas Tabelas XV e XVI êstes valores médios estão com boa aproximação com os valores 16000 : 800 : 400, tendo os auxocitas na realidade valores ligeiramente superiores (17-1800). Isto provavelmente é devido a dois fatores que já examinamos: a fórma elipsóide destas fases que nas pesquisas foi, pelo contrário, calculada como esfera e em segundo lugar por estarem estas células em profase e terem, portanto, uma alteração do volume devido a fatores físico-químicos (embebição, variações coloidais, etc.).

As espermatogônias são caracterizadas por três valores volumétricos distintos, ou seja, um volume correspondente ao dos elementos diploides, um volume (profase) que corresponde ao volume tetraploide que delimita a estensão do crescimento interfásico, do ciclo mitótico; dentre êstes limites, as espermatogônias têm mais um valor modal o qual é pelo menos nos Ofídios, o mais frequente e que corresponde estritamente a um volume de 3n. Esta moda intermediária no ciclo volumétrico mitótico é um dos fenômenos mais constantes na cariometria testecular dos Ofídios e representa uma fase do desenvolvimento intercinético que chamámos em trabalhos anteriores de "sesquifase".

O diagrama da Fig. 16 representa esta situação com grande clareza resumindo os correspondentes diagramas de correlação de todos os casos estudados.

Podemos, portanto, concluir que nos meiocitas a relação entre volume nuclear e número de genomas haploides que constituem o núcleo é absolutamente válida, se o volume considerado é o volume modal, isto é, de máxima frequência das curvas de variabilidade estatística. Voltaremos logo ao significado biológico desta constatação.

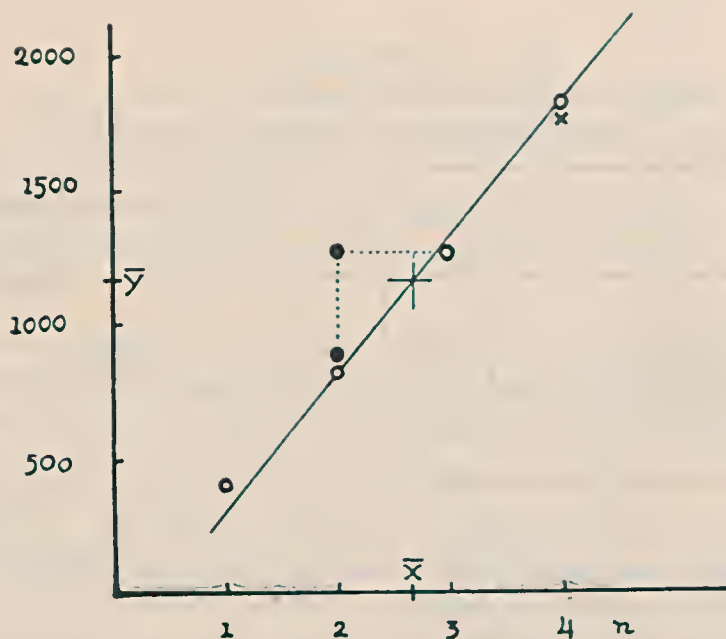



Fig. 16.
Correlação entre volume nuclear (val. modal) e múltiplos do genoma haploide. Valores médios entre 14 exemplares pertencentes a 11 espécies.
O — série meiótica
● — espermatogonia (interfase)
× — espermatogonia (profase)

b) *A "sesquifase" no ciclo mitótico*

Como temos discutido no Capítulo I a) os máximos de frequência das curvas dos volumes nucleares correspondem a estapas do crescimento. Estas etapas correspondem, geralmente, a valores múltiplos do genoma, antes e depois de um ciclo de duplicação. Isto vale sem dúvida nenhuma para tôda a série de valores volumétricos que estão entre si em relação como 1:2:4:8:16:32, sendo claramente demonstrado que os núcleos que alcançam estas etapas são respectivamente di, tetra, octo, 16-ploides.

O exame dos valores modais dos espermatogônias de cobra nos revela agora um fenômeno novo: as estapas do crescimento estão entre si em relação como 1 : 1,5 : 2 :, sendo o valor 1 igual ao volume do espermatocita de 2.ª ordem é portanto diploide. O valor 2 é o do volume da profase gonial e é igual ao do espermatocita de 2.ª ordem, isto é, tetraploide. A diferença entre êstes volumes corresponde, portanto, perfeitamente ao intervalo de duplicação do genoma diploide, seja no ciclo mitótico das espermatogônias, seja no ciclo de crescimento auxocitário.

A etapa de valor 1,5 que se revela como o estádio principal durante o crescimento interfásico mitótico deveria ser interpretada à luz dos conceitos até agora ilustrados e ser, portanto, considerada como um estádio no qual o genoma tem o valor de 3n, isto é, depois de ter duplicado metade do genoma diploide ou, um genoma haploide.

Já temos discutido esta possibilidade na introdução (Cap. Ib3.) como interpretação das "Zwischenklassen" das pesquisas cariométricas sôbre tecidos de adultos ou embriões normais e patológicos, nas quais, não se tem como nas presentes pesquisas, a possibilidade de controlar rigorosamente os valores volumétricos estudados com valores cromosômicos certos. Neste sentido somente as já citadas pesquisas de D'Ancona (13, 14) sôbre o fígado de mamifero e as da Escola de Painter (7) sôbre material neoplástico deram a demonstração da relação entre o volume "rítmico" e o diferente grau de poliploidismo dos núcleos.

A denominação de "sesquifase", ou seja, a fase de uma vez e meia maior do que a normal nos parece a mais adequada e mais estritamente ligada à natureza dos fenômenos estudados. Uma verificação direta desta interpretação em termos cromosômicos nos falta ainda por ter esta fase o aspecto morfológico de núcleo em repouso. É provável que nunca apareçam metafases correspondentes a êstes núcleos de 3n, mas em outras pesquisas cariométricas, sôbre as células uterinas (Salvatore, e Schreiber, 42), tivemos ocasião de verificar que os núcleos apresentam a série de volumes 1:1,5:2:3:4:6:8 e têm profases seja ao volume 2, como no volume 3. Isto poderia significar que núcleos sesquifásicos (1,5), continuando o crescimento interfásico até o valor tetraploide podem não iniciar a profase a êste valor, mas sim continuar a duplicar isoladamente os genomas haploides e iniciar a profase na situação hexaploide ou seja ao duplo da sesquifase.

Resumindo êste assunto podemos concluir que o *núcleo das espermatogônias durante o crescimento interfásico passa por um estádio de 1,5 vêzes o volume diploide no qual o crescimento para por um certo tempo para depois continua, até alcançar o volume da profase tetraploide e dividir-se em seguida.* Êste fenômeno está representado esquematicamente na Fig. 17 na qual estão também representadas as etapas volumétricas da série meiótica como contrôle da situação múltipla do genoma.

Devemos por fim evidenciar que com estas pesquisas sôbre o ciclo mitótico das espermatogônias a "sesquifase" parece ser uma fase de crescimento interfásico e não deixa dúvidas sôbre a identidade das células pertencentes às classes diferentes de volume como acontece no estudo cariométrico de tecidos diferentes e de espécies diferentes ou de casos patológicos nas quais aparecem as "Zwischenklassen" de mais ou menos 1,5 vêzes o valor das classes modais, e que foram assinaladas por G. Hertwig (29) e por Brummelkamp (11). Nestas presentes pesquisas a etapa de 1. 5 está integrada no ciclo de crescimento de

uma única espécie celular e portanto se homologa perfeitamente com as etapas de 1,5 vêzes verificadas por Wermel e Portugalow (57) na interfase das células cultivadas *in vitro* em pesquisas cinematográficas.

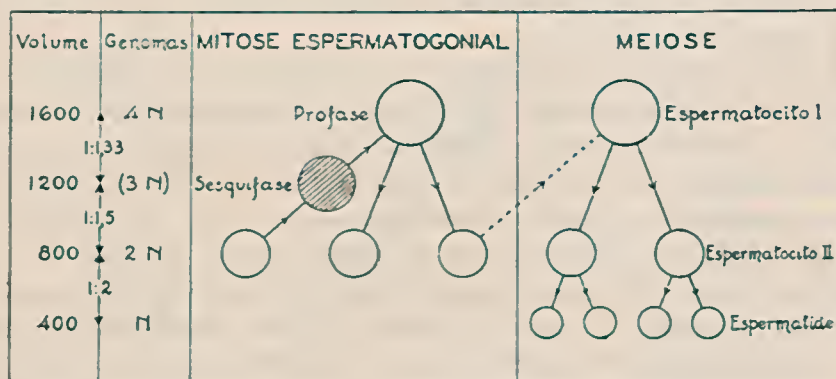



Fig. 17
Explicação no texto

Em outros trabalhos (Schreiber 49, 50) discutimos a base citológica teórica desta explicação do fenômeno da sesquifase e não queremos aqui continuar esta discussão antes de ter novos e mais positivos fatos para apoiá-la. Aguardemos por enquanto o fato fundamental, isto é, que *o núcleo cresce durante a interfase com um rítmo descontínuo cujas etapas correspondem a volumes múltiplos do volume haploide e não do volume diploide.* Êste fato confere ao genoma haploide pelo menos no que se refere ao rítmo de duplicação um valor unitário. Com isto não queremos decidir se êste genoma que duplicaria como uma entidade unitária seja constituído pelos cromosômios de igual origem gamética, ou por um "set" de cromosômios haploides independentes da sua origem gamética (como acontece no processo meiótico para o livre sorteamento dos cromosômios). A unidade neste sentido é mais fisiológica e não podemos dar, por enquanto, nenhuma explicação mais pormenorizada porque se refere à morfologia.

Várias possibilidades neste sentido foram sugeridas nos trabalhos já citados e achamos por enquanto necessário esperar novos fatos que o estudo morfológico possa nos fornecer em futuro para resolver o problema.

### c) *A "ritmicidade do crescimento interfásico*

Encontra-se frequentemente a objeção contra as pesquisas cariométricas, que a relação entre volume nuclear e número de cromosômios não pode ser um valor constante pois na determinação do volume nuclear intervem uma série de fatores extremamente variados como o grau de embebição hídrica, estado coloidal, per-

meabilidade da membrana, estádios de metabolismo, etc.. Precisamos esclarecer de fórma definitiva que êstes fatores determinantes do volume nuclear estão bem evidentes ao pesquisador e que êstes fatores não são constantes, quer no tempo quer nos diferentes tipos de células.

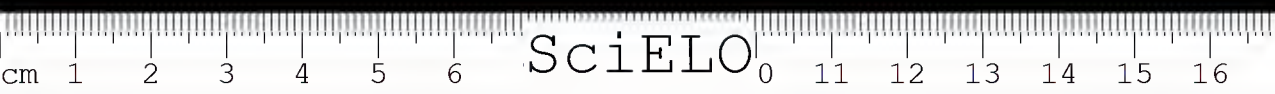
Devemos ainda considerar que êstes fatores se sucedem durante o desenvolvimento nuclear e que os diferentes mecanismos que determinam o volume nuclear concorrem de fórma diversa nas diversas fases dêste crescimento. Êste crescimento é, porém, determinado como causa prima pelo processo de duplicação do genoma que por uma sequela de fenômenos diferentes age sôbre o volume nuclear. Uma vez, porém, alcançada a duplicação, a constituição química e físico-química do núcleo deve ser tal que os materiais que acompanham o genoma na constituição morfológica do núcleo estão em relação quantitativa constante com o genoma mesmo. Se o genoma é duplo, duplicam também a quantidade de todos os elementos que constituem o núcleo "em repouso" de fórma que o volume dêste conjunto resulta também duplo. Sôbre êste conjunto que fórma o "resting nucleus" é que agem os fatores genéticos que às vêzes aparecem nas pesquisas cariométricas, alterando as relações previsíveis entre espécies ou variedades diferentes.

A validade do postulato da relação entre número de cromosômios e volume nuclear existe, portanto, somente no confronto das etapas entre as fases de crescimento nuclear e não durante os periodos de crescimento durante os quais o conjunto dêste sistema nuclear se encontra "em movimento" químico e físico-químico. Uma destas fases de movimento provavelmente é a reconstrução do núcleo telofásico até alcançar a situação típica do "resting".

Por estas razões é que somente os valores modais estão entre si em relação simples e constante, como os são os valores múltiplos do genoma ("Rhytmische Wachstum" de Jacobj) considerados como a "unidade" atomística da duplicação.

Esclarecidos êstes conceitos que nos parecem de notável valor explicativo podemos concluir que embora o estudo do volume nuclear nas fases de crescimento nada nos possa dizer no que se refere aos fenômenos químicos e físico-químicos que nele se processam, o estudo das relações quantitativas entre os volumes nucleares nas fases de parada dêste crescimento nos revela claramente uma estrita relação entre o valor quantitativo do genoma e o volume nuclear.

Isto quer dizer que nestas fases de parada o material gênico é sempre acompanhado por materiais acessórios que são sempre constantes seja em quantidade seja no estado físico-químico de fórma a determinar sempre, nos núcleor esféricos, um volume proporcional ao genoma.

Isto se depara das pesquisas cariométricas sôbre os poliploides que tivemos ocasião de estudar em outro trabalho (52) e nas atuais pesquisas sôbre a série

espermatogenética dos ofídios, ambos os casos nos quais os volumes nucleares puderam ser relacionados com o valor múltiplo do genoma seguramente acertado e nos quais o estudo do volume se processa com os princípios básicos estatísticos que evidenciaram as etapas do crescimento interfásico.

## V) RESUMO

O problema do crescimento interfásico do núcleo foi estudado sôbre o ciclo mitótico das espermatogônias nos Ofídios, tendo como base de confronto o volume do núcleo dos elementos da série meiótica nos quais o valor múltiplo do genoma haploide é perfeitamente conhecido.

Foi discutido o lado teórico do problema como também os fundamentos do método usado, que consistiu na medida do volume nuclear e no estudo estatístico da sua variabilidade. Foi considerado como ponto de partida o fato de serem os volumes modais correspondentes aos volumes das etapas durante o crescimento interfásico.

O estudo da série dos meiocitos revela uma estrita correlação entre volume nuclear e número de cromosômios. Esta validade porém é perfeita somente para os valores modais que representam fases homólogas do crescimento nuclear.

O crescimento das espermatogônias durante um ciclo interfásico abrange um intervalo de duplicação do volume, isto é, tem como base um volume correspondente ao volume dos núcleos diploides (igual ao dos espermatocitas de 2.ª ordem) e vai até o volume duplo, das proiases que correspondem ao do núcleo tetraploide das espermatogônias de 1.ª ordem no fim do crescimento auxocitário. Entre êste intervalo o crescimento volumétrico do núcleo gonial apresenta uma etapa a um volume que corresponde a um núcleo com genoma 3n, isto é, de 1,5 vêzes o volume inicial. Esta fase intermediária foi chamada de "sesquifase", é interpretada como provavelmente resultante da duplicação precoce de um genoma haploide. Nesta explicação hipotética não pode ser esclarecido se êste genoma corresponde aos cromosômios de igual origem gamética ou se a precocidade se manifesta ao acaso em um "set" haploide independentemente da sua origem. Outras interpretações, porém, poderiam ser dadas na espera de ulteriores pesquisas.

Como conclusão fundamental pode ser considerar que o crescimento interfásico do nucleo se dá por ciclos ("Rhytmische Wachstum" de Jacobj) cujos volumes finais correspondem a valores múltiplos do genoma haploide que, portanto, aparece como uma unidade no processo de duplicação.

ABSTRACT

The problem of the interphasic growth of the nucleus was studied on the mitotic cycle the spermatogonia of the Ophidia taking as basis for comparison the volume of the nucleus of the elements of the meiotic series, whose multiple value of the haploid genom is well known.

The theoretic side of the problem, as well as the principles of the method used, which consisted of the measurement of the nuclear volume and the statistic study of its variability, were discussed. The fact that the modal volumes of the nucleus correspond to the volumes of the stop during the interphasic growth was taken as starting point.

The study of the meiotic elements revealed a strict correlation between the nuclear volume and the number of cromosomes. This validity, however, is only perfect for the modal values which stand for the homologous phases of the nuclear growth.

The growth of the spermatogonia, during and interphasic cycle consists of a duplication of the volume, that is, at first it has a volume corresponding to that of the diploid nucleus (the same as that of the 2nd spermatocite) and then growth to twice the volume (prophases) which corresponds to the tetraploid nucleus of the 1st spermatocites at the end the auxocytic growth. During this space of time the volumetric growth of the spermatogonial nucleus passes a stage in which its volume corresponds to a nucleus with 3n genomes, that is 1.5 times the inicial volume. This intermediate phase has been called "sesquiphase" and is explained as probably ressulting, from a premature duplication of one haploid genome. It cannot be explained in this hypothesis whether this genom corresponds to cromosomes of the same gametic origin or whether the precocity occurs by chance in a haploid set independently of their origin. However, other interpretations can arise, until more researches are made.

As fundamental conclusion it may be maintained that the interphasic growth of the nucleus occurs in cycles ("Rhytmische Wachstum" by Jacobj) and that the final volumes of each cycle are multiple values of the haploid genom, which therefore may be considered as a unity in the process of duplication.

RIASSUNTO

Venne studiato l'accrescimento interfasico del nucleo dello spermatogonio durante il ciclo mitotico negli Ofidi, prendendo come termine di confronto dei volumi, quelli dei nuclei nella serie meiotica il cui valore multiplo del genoma

aploide è perfeitamente noto. Venne discussa la parte teorica del problema consistente nel fatto che nello studio statistico di nuclei in accrescimento i valori modali delle curve di frequenza corrispondono a pause dello accrescimento stesso.

Lo studio cariometrico degli elementi della serie meiotica rivela una strettissima correlazione tra volume e numero di cromosomi. Questa correlazione pero é valida solamente per i valori modali, vale a dire per fasi omologhe del accrescimento nucleare. Nella serie meiotica questi fenomeni si manifestano particolarmente chiari non essendovi accrescimento interfasico in queste cellule.

Lo spermatogonio si comporta differentemente avendo un ciclo di mitosi con accrescimento interfasico che si estende per un intervallo di duplicazione del genoma. Lo studio cariometrico di queste cellule mostra che vi sono tre valori modali, uno corrispondente al valore diploide, l'altro a quello tetraploide e corrisponde alla profase goniale. Tra questi due valori che limitano l'intervallo di duplicazione vi é una terza moda che in tutte le specie studiate è quella predominante, ad un valore eattamente corrispondente ad un genoma di 3n coe 1.5 volte la moda diploide. Questa fase nella quale i nuclei dello spermatogonio si fermano per una pausa durante l'accrescimento interfasico è stata chiamata precedentemente dall'A. "sesquifase" ed è interpretata come il risultato della duplicazione indipendente e sfasata nel tempo dei due genomi aploidi del nucleo diploide dello spermatogonio. Non viene per ora chiarito con questo se i due genomi corrispondono a cromosomi di egual origine gametica oppure se la duplicazione prematura avviene in un "set" aploi de di cromosomi assortiti a caso ed indipendentemente dalla loro origne gametica. Altre interpretazioni pero sono prospettate. Come conclusione fondamentale di queste ricerche risulta che il nucleo interfasico cresce a cicli ("Rhytmische Wachstum") di Jacobj e che i volumi finali di ogni ciclo corrispondono a valori multipli interi del genoma aploide il quale per cio si puo considerare come una unità nel processo di duplicazione che caraterizza l'interfase.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Amaral, Afranio do* — Contribuição ao conhecimento dos Ophidios do Brasil. VIII. Lista remissiva dos Ophidios do Brasil. 2.ª Ed. *Memórias do Instituto Butantan,* 10:87-161, 1935/35.

2. *Arkin, H. & Colton, R. R.* — An outline of statistical methods. 4th. Ed., New York. 1942.

3. *Beams, H. W. & King, R. L.* — The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat. *The Anat. Record,* 83:281-297, 1942.

4. *Biesele, J. L.* — Chromosome size in normal rat organs in relation to B. Vit., ribonucleic acid and nuclear volume. *Cancer Research,* 4:529-539, 1944.

5. *Biesele, J. L.* — Chromosome complexity in regenerating rat liver, *Cancer Research*, 4:232-235, 1944.

6. *Biesele, J. J.* — Chromosomes in Lymphatic Leukemia of C58 Mice. *Concer Reseorch*, 7:70-78. 1947.

7. *Biesele, J. L., Poyner, H. & Pointer, Th.* — Nuclear phenomena in mouse cancer. *The University of Texos Publications*, No. 4243:1-68, 1942.

8. *Bogojawlensky, R. S.* — Studien über Zellengrosse und Zellenwachstum. XI. Mitt. Über Beziehungen zwischen Struktur und Volumen der somatische Kernen be: Larven von Anopheles maculipennis. *Zeitschr. Zellf. u. mikr. Anatomie*, 22:47, 1935.

9. *Brachet, J.* — Embryologie chimique. Masson, Paris, 1944.

10. *Breton, le E. & Schoeffer, G.* — Variations biochimiques du rapport nucleo-plasmatique au cours du developpment embryonnaire. Fac. Med. de Strasbourg: Travaux de l'Inst. de Physiologie. Masson, Paris, 1923.

11. *Brummelkomp, R.* — Das sprungweise Wachstum der Kernmasse *Acta Neerl. Morphologioe*, 2:178-187, 1939.

12. *Conklin, E. G.* — Cell size and nuclear size *J. exper. Zoology*, 12, 1912.

13. *D'Ancona, U.* — Grandezze nucleari e poliploidismo nelle cellule somatiche. *Monitore Zoologico Italiano*, 50(8-9):225-231, 1939.

14. *D'Ancona, U.* — Sul poliploidismo delle cellule epatiche *Boll. Soc. Ital. Biologia sperim.*, 16(1):49-50. 1941.

15. *Dussa, M.* — Beitr. zur vergl. Anat. der Zellengrosse an der Entwicklung. *Anot. Anzeiger*, 91, 1941 (Cit. Paccagnella).

16. *Enriques, P.* — Sull'aumento della sostanza nucleare nello sviluppo embrionale nella Aplysia limacina. *Rend. R. Acad. delle Scienze dell'Istituto di Bologna* (Cl. Sci. Fis.), 1913-14.

17. *Enriques, P.* — La formazione della sostanze nucleare nello sviluppo. Studio biometrico nella Aplysia limacina. *"Bios"*, 2:183-193. 1914.

18. *Fouré-Frémiet, E.* — La cinétique du développement. Les Presses Univ. de France, Paris. 1925.

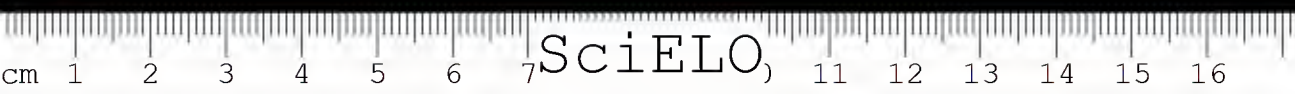
19. *Freerksen, E.* — Ein neues Beweis für das rhytmische Wachstum der Kerne durch vergl. volumetrische Untersuchungen am dem Zellkerne von Meerschweinchen und Kaninchen. *Zeitschr. Zellf. u. mikr.*, 18, 1933.

20. *Geitler, L.* — Das Wachstum des Zellkernes in tierischen und pilantzliche Gewebe. *Ergebnisse der Biologie*, 18:1-54, 1941.

21. *Godlewsky Jr.* — Plasma und Kernsubstanz in der normalen und in der durch äussere Faktoren veränderte Entwicklung der Echiniden. *Arch. f. Entwicklungsmechonik*, 26:278, 1908.

22. *Godlewsky, E.* — (citado por Huxley e De Beer e Brachet). *C. R. S. Biologie*. Reun. Plen. 24 avril 1925.

23. *Goldschmidt, R.* — Physiological genetics. New York Mc Graw Hill Co., 1938.

24. *Hertwig, G.* — Die hypothese des Kerns und Chromosomes Wachstums durch rhytmiche Volumenverdoppelung. *S. B. Abh. Nautrf. Gesellsch. Rostok.*, 3. Folge Bd 3, 1930-32.

25. *Hertwig, G.* — Allg. Betrachtungen über Kernwachstum und Kernteilung auf Grund eines Vergl. der Kerngrosse von somatische und generative Zellen bei Maus und Ratte. *S. B. Abh. Naturf. Gesellsch. Rostock.*, 3 Folge Bd 3:549-558, 1942.

26. *Hertwig, G.* — Die Vielwertigkeit der Speicheldrusenkerne und Chromosomen bei Drosophila melanogaster. Z. *Abstammungslehre*, Bd. 70, 1932.

27. *Hertwig, G.* — Die Befruchtungs-und Vererbungsproblem im Lichte der vergleichend-quantitativen Kernforschung. *Anat. Anzeiger* (Vern. Anat. Ges.), **75**, 1932.

28. *Hertwig, G.* — Die dritte Reifeteilung in Spermiogenese des Menschen und der Katze. Z. *mikr. anat. Forsch.*, **33**, 1933.

29. *Hertwig, G.* — Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung. *Anat. Anzeiger*, **87**:65-73, 1938-39.

30. *Hertwig, G.* — Der Furchungsprozess des Mauseeies ein Beispies für die wiederholte Volumenhalbierung polimere Kerne und Chromosomen durch multiple succedan Teilungen. Z. *mikr. Anat. Forsch.*, **45**, 1939.

31. *Huxley, J. S. & De Beer, G. R.* — The elements of experimental Embriology. Cambridge, 1934. Cambr. Univ. Press.

32. *Jacobj, W.* — Über das rhytmische Wachrtum der Zellen durch Verdoppelungs ihre Volumens. *Arch. f. Entwickungsmechanik*, **106**, 1925.

33. *Jacobj, W.* — Über das Wachstum der Zellen nach einem Gesatz der konstanten Proportionen. *Munch. Mediz. Wochenschr.*, **20**:859, 1926.

34. *Jacobj, W.* — Die Kerngrosse der mannlichen Geschtszellen beim Saugetieren in Bezug auf Wachstum und Reduktion. *Ztschr. f. Anat. u. Entwichlungschschichte*, **81**:563, 1926.

35. *Jacobi, W.* — Volumetrische Untersuchungen an den Zellenkernen des Menschen und das allgemeine Problem der Zellkerngrösse. *Anat. Anzeiger*, **72**, 1931 (Verh Anat. Gesellsch. Bressalu) 1931.

36. *Levi, G.* — Studi sulla grandezza delle cellule. III. Le modificazioni della grandezza cellulare e nucleare e dell' indice plasmatico-nucleare durante i piu' precoci periodi dell'ontogenesi dei Mammiferi. *Rivista de Biologia* (25.° anniv. Lustig), 1915.

37. *Levi, G. & Terni, T.* — Le variazioni dell'indice, plasmatico-nucleare durante l'intercinesi. *Archivio Italiano d'anatomia ed embriologa*, **10**:545, 1911.

38. *Meyer, R.* — Zur Statistik der Verteilung nukleare e Stoffe. Zugleich eine Kritik der bisherigen variationstatistischen Untersuchungen der Kernvolumina. *Zeitschr. Zellf. u. mikr. Anatomie* **25**:353, 1937.

39. *Möllendorff, v. W.* — Zur Kenntniss der Mitose II. Auszählung der Phasenprozente im fixirtem Praparaten. *Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anatomie*, **27**(3):303-325, 1937.

40. *Morgan, Th. H.* — Embriology and Genetics, New York, 1934.

41. *Paccagnella, B.* — Richerche quantitative sulle grandezze nucleari nelle cellule epatiche di Axolotl. *Atti R. Ist. Veneto di Scienze Lettere ed Arti*, **104**:433-466, 1944-45.

42. *Painter, Th.* — Nuclear phenomena associated with secretion in certain gland cells with special reference to the origin of cytoplasmic nucleic acid. *J. exper. Zool.*, **100**(3): 523-539, 1945.

43. *Salvatore, C. A. & Schreiber, G.* — Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravidico. *Memórias do Instituto Butantan*, **20**, 1947.

44. *Sauser, G.* — Die Grösse der Zellkerne in verschiedenen Tierklassen unter Berücksichtigung des Geschlechtes der Domestikation end Kastration. *Zeitschr. f. Zellf. v. mikr. Anatomie*, **23**:681. 1936.

45. *Schreiber, B.* — Richerche sulla spermatogenesi accelerata nelle Anguille. *Archivio Zoologico Italiano*, **24**:147-167, 1937.

46. *Schreiber, B. & Angeletti, S.* — Rhytmic increase and decrease of nuclear volume of the hepatic cells of the Carp Cyprinus carpi var. specularis. *Anat. Record*, **76**:431-439, 1940.

47. *Schreiber, G.* — La definizione degli stadi della metamorfosi del Bufo. *Rend. R. Academia Naz. Lincei. Roma*, **25**:342, 1937.

48. *Schreiber, G.* — Discontinuous and proportional decreasing of nuclear size in the liver of tadpoles during development and metamorphosis. *Anat. Record*, **81**:80 (Suppl. Am. Soc. Zool.), 1941.

49. *Schreiber, G.* — O volume do núcleo durante o desenvolvimento embrionário e a interfase. *Revista de Agricultura*, **18**(11-12):453-474, 1943 (Semana da Genetica, Piracicaba).

50. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa: o crescimento interiásico da espermatogonia nos Ofidios. *Revista Brasileira de Biologia*, **6**(2):199-209, 1946.

51. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. II. A terceira divisão e a dimegalia na espermatogenese dos Ofidios. 1.ª Reun. Conjunta das Sociedades de Biologia do Brasil. São Paulo, 1946.

52. *Schreiber, G.* — Estudo cariométrico dos poliploides de *Coffea*. Discussão do problema e primeiros resultados. *Bragantia*, Campinas, **7**:279-298, 1946.

53. *Schreiber, G. & Romano Schreiber, M.* — Diminuição ritmica do volume nuclear do fígado e do pâncreas nos girinos de Anuros. Boletim Fac. Filos., Ciências e Letras da Universidade de S. Paulo, XXI. Zoologia, **5**:234-264, 1941.

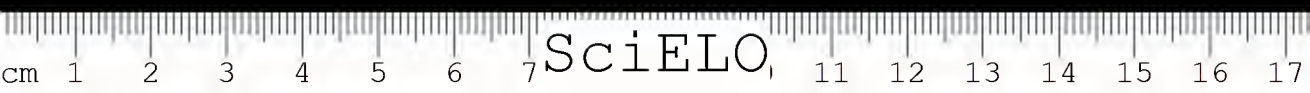
54. *Spuhler, O.* — Genitalzyclus und Spermiogenese der Mausmaki (Nicticebus murinum Mull.). *Zeitschr. Zell. u. mikr. Anatomie*, **23**(4):442-463, 1936.

55. *Sulkin, Norman M.* — A study of the nucleus in the normal and hyperplastic liver of the rat. *Am. J. Anat.*, **73**(1):107-125, 1943.

56. *Wermel, E.* — Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. Mitt. IV. Über dimension der Samenzelle u. s. w. der Seidenraupen. *Zeitschr. Zellf. und mikr. Anatomie*, **17**:505, 1933.

57. *Wermel, E. & Portugalow, W. W.* — Studien über Zellengrösse und Zellenwachstum. XII. Mitt. Ueber der Nachweis des rhytmischen Zellenwachstums. *Zeitschr. Zellf. und mikr. Anatomie*, 22:183, 1935.

58. *Wermel, E. & Scherschulskaya, L. W.* — Studien uber Zellengrösse und Zellenwachstum. VIII. Mitt. Ueber proportionelle rhytmische Wachstum. *Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anatomie*, **20**:459, 1934.

59. *Ziegler, Kraemer, D.* — Epidermal nuclear size changes in methylcholanthrene induced carcinogenesis. *Anat. Record*, **94**(3):289-310, 1946.

# NOTAS ERPETOLOGICAS

## 2. *Dimorfismo sexual nos Boídeos*

POR A. HOGE

*(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

Desde muito tempo são conhecidas as variações a que estão sujeitos os esporões pélvicos dos Boideos, variações estas ligadas ao sexo.

Boulenger. 1913. chama a atenção para este ponto "Spurs usually visible externally at least in males".

Stickel & Stickel, 1946, mencionam dados não publicados de Blanchard sôbre o dimorfismo sexual verificado nos esporões de Boídeos Americanos.

Dwight, 1936, referindo-se aos esporões dos Boídeos escreve "In the male of many species this structure is a comparatively large, curved hook, whereas in the females is its often reduced to a tiny horny projection (fig. 32). It is not konw whether the hypertrophy of this structure in males is correlated with the onset of puberty, and the material at hand is not extensive enough to determine this by an examination of series of immature and adult specimens of both sexes".

Stickel & Stickel, 1946, estudam a forma e o tamanho dos esporões no *Enygrus* em relação ao tamanho total e à maturidade sexual: "The spurs are present in all males of the series. They are well developped even in the newely born (200-250 mm. size group). Spurs are absent in all the juvenile females studied. Spurs are absent in six of the nine females of mature size(1. 3. in 67 per cent). When spurs are present in females they are about half as long as in the male snakes of similar total, length, and are more or less concealed by the surrounding scales. The spurs of males are curved into a hook in females the spurs are straighter and more uniformly tapered. The spurs of males do not undergo a sudden growth at the onset of puberty. Instead, they are conspicuous at birth, and inspection of the graph suggests that they developed gradually in direct proportion to the growth of the snake in total length. The left and right spurs are usually of the same size, but in either sex one spur may be as much as twice as long one on the opposite side".

---

Recebido para publicação em 25-6-47.

Examinando exemplares de *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758), com o fim de verificarmos a ocorrência do dimorfismo sexual nos esporões, notamos ausência do ílio nos exemplares fêmeas de serpentes desta espécie. O exame de todos os exemplares da coleção do Instituto Butantan, veio confirmar a nossa primeira observação.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material examinado consta de 52 exemplares conservados, sendo 23 machos e 29 fêmeas. Além destes espécimes, examinamos vários exemplares vivos, a fim de podermos julgar das eventuais modificações, determinadas pela conservação durante longo periodo de tempo.

Os esporões e ilios foram medidos por meio de um calibrador, permitindo desta maneira maior exatidão nas medidas. Para a confecção dos gráficos tomamos sómente em consideração as medidas da parte visível dos esporões, isto é, da parte não recoberta pelas escamas, porque notamos que o dimorfismo sexual é mais pronunciado em relação a esta medida do que em relação à do comprimento total dos esporões. Quando havia diferença de tamanho entre o lado direito e o esquerdo, tomavamos sempre em consideração a medida máxima.

Os ossos pélvicos com os respectivos esporões foram sempre que possível tirados do lado esquerdo, a fim de se deixar o outro lado intacto para futuras observações ou verificações; em seguida eram medidos e montados em laminas numeradas e fichadas.

### RESULTADOS

*Esporões* — Podemos resumir da seguinte maneira as nossas observações sôbre os esporões pélvicos: o maior comprimento da parte visivel dos esporões nos machos, isto é, da parte não recoberta pelas escamas, é devida não sómente a um maior tamanho deste órgão, mas também em grande parte à presença de um ílio (fig. 1), que impele o esporão para fóra evitando que esteja parcialmente recoberto pelas escamas vizinhas; em todos os machos os esporões estão presentes e bem visiveis, mesmo nos recem-nascidos; o crescimento dos esporões é proporcional ao aumento do comprimento total da serpente, não estando por conseguinte o desenvolvimento deles ligado à puberdade; nos esporões das fêmeas, quando presentes, a parte visivel é aproximadamente 3 vezes menor do que nos machos de tamanhos correspondentes; nas fêmeas os esporões não são aparentes na classe de 500 a 1000 mm; os valores encontrados nos machos não se afastam muito da linha de regressão; nas fêmeas a dispersão é muito maior (gráfico 1) quanto a forma, os esporões dos machos são mais recurvados do que os das fêmeas (fig. 1), o que concorda com as observações de Stickel & Stickel no *Enygrus*.

*Ilio* — O exame dos exemplares confirma a nossa primeira observação sôbre a ausência do ilio nas fêmeas de *Constrictor constrictor constrictor* (L).

O exame dos gráficos permite as seguintes conclusões: o ilio é completamente inexistente em todos os exemplares examinados; em todos os machos estudados o ilio é sempre presente e bem ossificado (num único exemplar No. 7597, o ilio apresentava uma forma fibrosa).

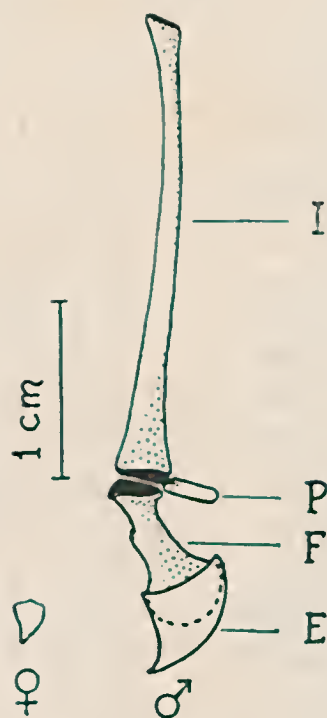



FIG. 1
Ossos pelvicos e esporão de *Constrictor constrictor constrictor*
I — Ilio
P — ischio-pubis
F — femur
E — esporão

A regressão do comprimento do ilio sôbre o comprimento total da cobra segue visivelmente uma reta até o tamanho de 2000 mm. Um exemplar de mais de 2500 mm apresenta uma notável redução do tamanho do ilio em relação ao comprimento total (gráfico 2). Si conseguimos um grande número de exemplares de *Constrictor constrictor constrictor* entre 2000 e 3000 mm poderemos verificar si se tratou de uma dispersão maior nestes tamanhos ou si se trata de uma curva de saturação ao invés de uma reta, razão pela qual deixamos pelo momento de fazer o estudo estatístico da curva.

*Lista dos exemplares de* Constrictor constrictor constrictor (L)

| N.° na col. Inst Butantan | Procedência | Sexo | Esporões mm. | Compr. total mm. | Ilio mm. |
|---|---|---|---|---|---|
| 6284 | Corrego Fundo, S. Paulo, Brasil | ♂ | 0,8 | 480 | 3,8 |
| 2143 | Sem procedência | ♂ | 0,0 | 490 | 3,8 |
| 7544 | Lins, S. Paulo, Brasil | ♂ | 0,9 | 495 | 4,2 |
| 7492 | Sapezal, S. Paulo, Brasil | ♂ | 0,7 | 500 | 5,7 |
| 8504 | Santa Lina, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 510 | 0,0 |
| 6915 | Araguary, Minas Gerais, Brasil | ♂ | 0,5 | 520 | 5,0 |
| 7903 | Santa Adelia, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 525 | 0,0 |
| 7839 | Matão, S. Paulo, Brasil | ♂ | 0,8 | 535 | 4,2 |
| 9085 | Saint Martin, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 550 | 0,0 |
| 8760 | Monção, Rio de Janeiro, Brasil | ♀ | 0,0 | 560 | 0,0 |
| 9626 | Oiti, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 560 | 0,0 |
| 6135 | Lins, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 565 | 0,0 |
| 7546 | Lins, S. Paulo, Brasil | ♂ | 0,0 | 610 | 0,0 |
| 8761 | Monção, Rio de Janeiro, Brasil | ♂ | 1,4 | 625 | 3,0 Quebrado |
| 8428 | Itapetininga, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 630 | 0,0 |
| 8641 | Santos, S. Paulo, Brasil | ♂ | 1,4 | 645 | 4,8 |
| 7501 | Piratininga, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 650 | 0,0 |
| 7597 | Continental, S. Paulo, Brasil | ♂ | 1,1 | 645 | 5,0 Fibroso |
| 8308 | Ipanema, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 650 | 0,0 |
| 6968 | Vera Cruz, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 660 | 0,0 |
| 7148 | Ribeirão Preto, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 670 | 0,0 |
| 9627 | Pirajui, S. Paulo, Brasil | ♂ | 1,2 | 680 | 4,9 |
| 7852 | Loreto, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 770 | 0,0 |
| 5928 | Passagem, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 770 | 0,0 |
| 5929 | Franca, S. Paulo, Brasil | ♂ | 2,1 | 800 | 4,3 |
| 4503 | Tapajóz, Pará, Brasil | ♀ | 0,0 | 800 | 0,0 |
| 10089 | Porto Berrio, Colombia | ♂ | 1,5 | 800 | 7,6 |
| 9095 | Monção, Rio de Janeiro, Brasil | ♂ | 2,0 | 870 | 7,0 |
| 5830 | Monlevade, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 880 | 0,0 |
| 5827 | Barretos, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 900 | 0,0 |
| 5831 | Lins, S. Paulo, Brasil | ♂ | 2,0 | 985 | 8,7 |
| 9733 | Maceió, Alagoas, Brasil | ♀ | 0,0 | 1010 | 0,0 |
| 9722 | Maceió, Alagoas, Brasil | ♀ | 0,0 | 1020 | 0,0 |
| 10769 | Toriba, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 1020 | 0,0 |
| 10011 | Terenos, Mato Grosso, Brasil | ♀ | 0,0 | 1020 | 0,0 |
| 1496 | Ribeirão Bonito, S. Paulo, Brasil | ♂ | 2,2 | 1170 | 14,2 |
| 1615 | Iguatemi, S. Paulo, Brasil | ♂ | 2,1 | 1210 | 13,0 |
| 1427 | Sampaio Vidal, S. Paulo, Brasil | ♀ | 1,3 | 1270 | 0,0 |
| 5637 | Taunay, Mato Grosso, Brasil | ♂ | 3,1 | 1380 | 18,0 |
| — | Serpentario do Instituto Butantan | ♂ | 3,2 | 1400 | 20,8 |
| — | Serpentario do Instituto Butantan | ♀ | 0,6 | 1530 | 0,0 |
| 10896 | Canindé, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,0 | 1540 | 0,0 |
| 5650 | Santa Adelia, S. Paulo, Brasil | ♀ | 0,5 | 1540 | 0,0 |
| 7495 | Pocatuba, Sergipe, Brasil | ♂ | 3,7 | 1545 | 18,7 |
| — | Serpentario do Instituto Butantan | ♂ | 4,0 | 1580 | ? |
| — | Serpentario do Instituto Butantan | ♂ | 3,7 | 1590 | 23,5 |
| 2005 | Trinidad? | ♀ | 0,0 | 1610 | 0,0 |
| 275 | Pernambuco (Estado), Brasil | ♀ | 2,6 | 1690 | 0,0 |
| — | Serpentario do Instituto Butantan | ♀ | 1,3 | 1760 | 0,0 |
| 1536 | Sorocaba, S. Paulo, Brasil | ♂ | 5,5 | 1960 | 26,5 |
| 731 | Sorocaba, S. Paulo, Brasil | ♀ | 1,5 | 2015 | 0,0 |
| 4620 | São Fidelis, Ipuca, Rio de Janeiro, Brasil | ♂ | 5,6 | 2670 | 23,5 |

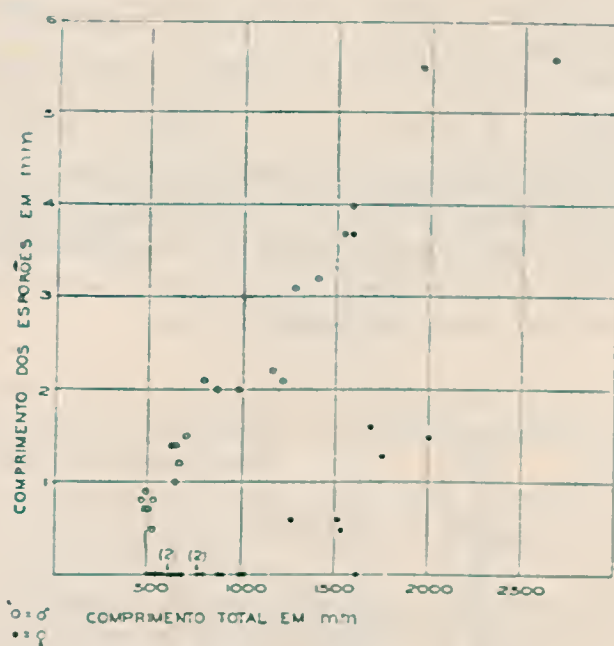
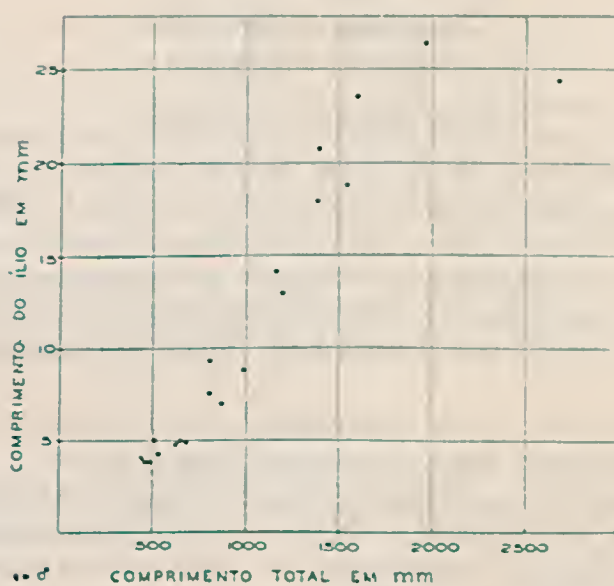
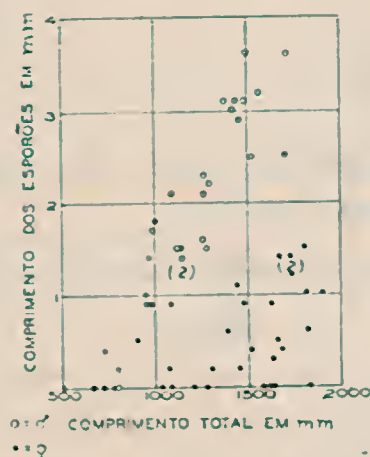
GRÁFICO I

Esporões de *Constrictor constrictor constrictor*

GRÁFICO II

Ilio de *Conctrictor constrictor constrictor*

Como nos outros Boídeos e ílio dá inserção a vários músculos. A contração destes músculos projeta o esporão para fora ficando desta maneira completamente liberado das escamas vizinhas.

A mobilidade dos esporões devida à contrações musculares parece-nos mais um argumento em favor da atuação dos esporões, seja como fixadores, seja como excitadores durante a copula.

Examinado alguns exemplares de *Constrictor constrictor imperator* (Daudin, 1803), *Constrictor constrictor occidentalis* (Philippi, 1873), *Constrictor constrictor mexicanus* (Jan, 1864), notamos também maior comprimento dos esporões nos machos e a falta de ílio nas fêmeas, porém o número relativamente reduzido de exemplares não nos permitiu conclusões definitivas.

GRÁFICO III

Esporões de *Boa hortulana hortulana*

Examinamos também séries de *Boa hortulana hortulana* (L. 1758), *Boa hortulana cookii* (Gray, 1842), *Epicrates cenchria cenchria* (L. 1758), *Epicrates cenchria crassus* (Cope, 1862), assim como alguns exemplares de *Boa canina* (L. 1758), e outros Boídeos, não observamos a ausência de ílio nas fêmeas. Possivelmente o exame de maior número de exemplares destas espécies e espécies de gêneros afins confirmará a nossa impressão de tratar-se de um possivel caracter genérico.

Existem dimorfismo sexual seja quanto ao comprimento, seja quanto ao volume do ílio nas espécies onde as fêmeas são providas deste osso.

No que concerne o maior desenvolvimento dos esporões dos machos, o facto parece ser geral para os Boídeos. Damos a título de comparação um gráfico mostrando a relação entre o comprimento dos esporões e o comprimento total em *Boa hortulana hortulana* (L.) (gráfico 3).

RESUMO

São aqui estudadas as relações entre o comprimento dos esporões e o comprimento total em *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758), onde se demonstra o marcado dimorfismo sexual.

É descrito como caracter sexual, a ausência de ílio nas fêmeas dessa mesma espécie, com a provável generalidade do fenômeno no gênero *Constrictor*.

Depende a aceitação do fenômeno como caracter genérico do exame de maior número de exemplares entre os representantes do gênero *Constrictor* e gêneros afins.

ABSTRACT

This paper deals with the relation between length of spurs and total length of *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758). The existence of marked sexual dimorphism could be shown.

Absence of the Ilium in females of this species is described as a sexual character and the hypothesis pull forward that this peculiarity is a possible generic character for the *Constrictor* genus.

Further examination of large series of the various species of the *Constrictor* genus and related genus are necessary in order to appreciate the significance of this phenomenon as generic character.

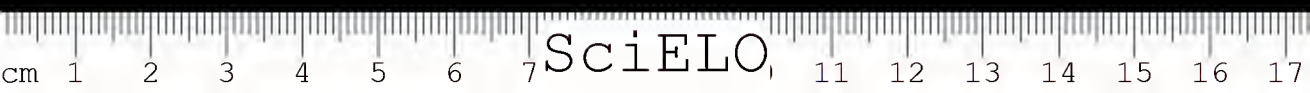
ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit werden Beziehungen zwischen der Laenge der Nagelglieder und der totalen Laenge von *Constrictor constrictor constrictor* (L. 1758) studier und der ausgesprochene sexuelle Dymorphismus dargelegt.

Die Abwesenheit des Iliums der Weibchen der gleichen Spezies wird als Geschlechtscharavter beschrieben und dieses Merkmal wird als ein moegliches generisches Merkmal, das allen Weibchen des Genus *Constrictor* zukommt, dargestellt.

Die Gewissheit dieses generischen Geschlechtsmerkmales haengt von der Untersuchung und Vergleichung einer groesseren Anzahl von Tieren von der Gattung *Constrictor* und anderen werwandten Gattungen ab.

BIBLIOGRAFIA

1. *Boulenger, G. A.* — The snakes of Europe. London, 1913, v. 11, pp. 269.
2. *Dwight, E. D.* — Courtship and mating behavior in snakes, *Zool. Ser. Field. Mus. Nat. Hist.*, **20**:257-290, 1936.
3. *Stickel, W. H. & Stickel, L. F.* — Sexual dimorphism in the pelvic spurs of *Enygrus Copeia*, **1**:10, 1946.

# NOTAS OFIOLÓGICAS

## 20. *Descrição do alotipo de* Dryophylax rutilus *Prado, 1942*

POR ALCIDES PRADO

*(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

A presente descrição já devia ter saido há mais tempo. Motivos vários obrigaram-me a retardá-la, sem prejuizo, entretanto, de qualquer natureza, no que respeita à sistemática.

Trata-se, ao que me parece, de uma boa espécie, a qual, agora completada pelo exame do hemipenis, separa-se perfeitamente de sua afim *Dryophylax pallidus strigillis* (Thunberg, 1787). É bem verdade que na primeira publicação, seu relato firmou-se num exemplar que foi escolhido para tipo, e em quatro outros que foram considerados como paratipos. Mesmo assim, alguns caracteres foram no presente melhor estudados, inclusive o da pupila, que é muitas vêzes de difícil observação neste grupo de animais.

### *Dryophylax rutilus* Prado

♂ — Corpo cilíndrico. Cabeça pouco distinta do pescoço. Olho moderado, com pupila eliptica-vertical. Cauda um tanto longa, com ponta afilada.

Rostral pouco mais larga do que alta, apenas visivel de cima; internasais quase tão largas quanto longas, mais curtas do que as prefrontais; estas últimas também quase tão largas quanto longas; frontal quase 2 vêzes tão longa quanto larga, pouco mais longa do que sua distância da extremidade do focinho, mais curta do que as parietais; loreal mais longa do que alta; 1 preocular que atinge a parte superior da cabeça; 2 postoculares; temporais 2+3; 9 supralabiais, 5.ª e 6.ª junto ao olho; 5 infralabiais em contacto com a mental anterior, que muito mais desenvolvida do que a posterior. Escamas lisas, sem fossetas apicilares, em 19. Ventrais 134; anal dividida; subcaudais 72/72.

Recebido para publicação em 1.° de julho de 1947.

Colorido mais ou menos semelhante ao da fêmea: cinza-olivácea em cima, com manchas negras parecidas com pingos de tinta, entremeadas de outras claras; cabeça da cor geral, porém com um traço negro lateral que vai do olho atrás à comissura labial; lábios branco-amarelados, debruados de negro, e com u'a mancha vermelha, orlada de negro externamente, sobre a parte posterior da 6.ª infralabial (7.ª no tipo); partes inferiores amareladas, com uma barra avermelhada, guarnecida de pontos negros, em cada uma das margens das ventrais, além de pontilhados negros medianos, em linha.

Hemipenis simples, capitato, com cálices abundantes na porção apicilar, cerca de $\frac{1}{3}$ do órgão (os cálices ocupam a metade apiciliar em *D. pallidus strigilis*); cálices arredondados, superficiais e semi-franjados (mais profundos e imperceptivelmente franjados em *D. pallidus strigilis*); sulco bifurcado; espinhos numerosos na parte não caliculada, aumentados gradativamente de tamanho de cima para baixo, e esparsos na porção basilar (espinhos proporcionalmente maiores, e os da porção basilar muito grandes em *D. pallidus strigilis*).

Comprimento total 482 mm; cauda 135 mm.

Alotipo, adulto ♂, sob o No. 10.563, na coleção do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.

Procedência: Lauro Müller, E. F. Noroeste do Brasil, S. Paulo, com data de recebimento: 12-10-1945.

### RESUMO

Descreve-se o alotipo de *Dryophylax rutilus* Prado, 1942, espécie que foi, na primeira publicação, considerada afim de *Dryophylax pallidus strigilis* (Thunberg, 1787), da qual parece separar-se perfeitamente.

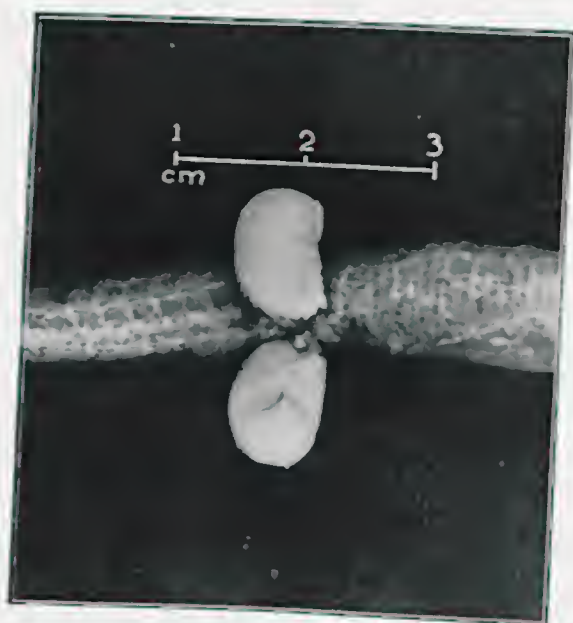
### ABSTRACT

Description of the allotype of *Dryophylax rutilus* Prado, 1942, in a former paper, this species was considered german to *Dryophylax pallidus strigilis* (Thunberg, 1787) from which it can be separated perfectly.

### BIBLIOGRAFIA

*Prado, A.* — *Ciência* (México) 3(7):204, 1942.

*Dryophylax rutilus* Prado, ♂
(face dorsal)

*Dryophylax rutilus* Prado, ♂
(face ventral)

*Dryophylax rutilus* Prado,
(hemipenis)

Mem. Inst. Butantan,
20:193-202, Dez.° 1947.



# NOTAS ERPETOLÓGICAS

## 3. *Uma nova espécie de* Trimeresurus

POR A. HOGE

*(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)*

Ao examinarmos um lote de cobras procedentes dos arredores de Pau Gigante, Espirito Santo, Brasil, foi a nossa atenção despertada pelo aspecto delgado e colorido diferente de alguns exemplares de *Trimeresurus*. Um exame mais minucioso indicou-nos tratar-se de uma espécie nova que dedicamos ao Dr. Alcides Prado, Chefe da Secção de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material que serviu para descrição da nova espécie consiste em 20 exemplares todos procedentes dos arredores de Pau Gigante no Espirito Santo, Brasil.

As medidas de comprimento do corpo foram feitas por meio do metro comum, enquanto as medidas das cabeças foram executadas por meio de um calibrador permitindo leituras da ordem de 0,1 mm.

O comprimento da cabeça que usamos no trabalho é dado pela distância entre a extremidade do focinho e a parte posterior da mandíbula, esta medida conforme já observou Klauber é praticamente igual ao verdadeiro comprimento da cabeça do momento que se toma esta medida com um ângulo pequeno relativo a linha mediana do corpo.

O estado de conservação dos exemplares não permitiu medidas muito exatas. Para o estudo da regressão do comprimento da cabeça sôbre o comprimento do tronco *Trimeresurus pradoi* usamos o método dos mínimos quadrados e graduamos uma reta de equação $Y = 3.635 + 0,0385\ X$ com erro-padrão da estimativa igual a 1,008. A propriedade desta adaptação é assegurada pelo quociente $F = 252,28$ (para $n_1 = 1$ e $n_2 = 17$) entre a variança devida à regressão e a variança residual.

Recebido para publicação em 10-7-47.

O material que serviu para comparação dos caracteres é uma amostra de *T. atrox* (L), infelizmente extremamente heterogenea, tanto quanto a procedência quanto no que concerna o estado de conservação.

Graduamos tambem uma reta de regressão para esta espécie: Y = 4,2124 0,4354 X. Os hemipenis foram preparados segundo a técnica corrente no Instituto ou seja, injetados com parafina quente depois de terem sidos devaginados, e a base ligada.

*Trimeresurus pradoi*, sp. n.

*Descrição do holotipo*: ♂, sob No. 10.603, na coleção do Instituto Butantan (fig. 1).

Rostral mais alta do que larga; nasal dividida; escamas da cabeça pequenas e fortemente carinadas, em 10 séries entre as supraoculares que são grandes e mais alongados do que se observa em *T. atrox* (L); duas internasais; cantais bem desenvolvidas; duas postoculares; uma subocular, separada das supralabiais por uma série de pequenas escamas; 7 supralabiais, 2.ª formando o bordo anterior da fosseta lacrimal; poro nasal ausente; infralabiais 9-10 dorsais em 25 séries fortemente carinadas (carena alta e larga); ventrais 203; anal inteira; subcaudais 63/63.

Coloração cinza-parda, com manchas escuras dispostas em forma triangular, separadas por um grupo de 10 manchas pequenas (fig. 2).

Ventrais largamente maculadas de pardo-cinza escuro (fig. 5): supralabiais e labiais fortemente manchadas de escuro. Uma estria escura do olho até o canto da boca; cabeça com um grupo de manchas apenas distintas.

| | |
|---|---|
| Comprimento total. | 1110 mm |
| Cauda ........... | 140 mm |
| Cabeça ........... | 39,3 mm |

*Procedência* — Pau Gigante, Estado do Espírito Santo, Brasil

*Remetente* — Dr. Annibal Pereira

*Descrição do alotipo*: ♀. No. 10.694 na coleção do Instituto Butantan.

Fig. 1
*Trimeresurus pradoi*, sp. n.

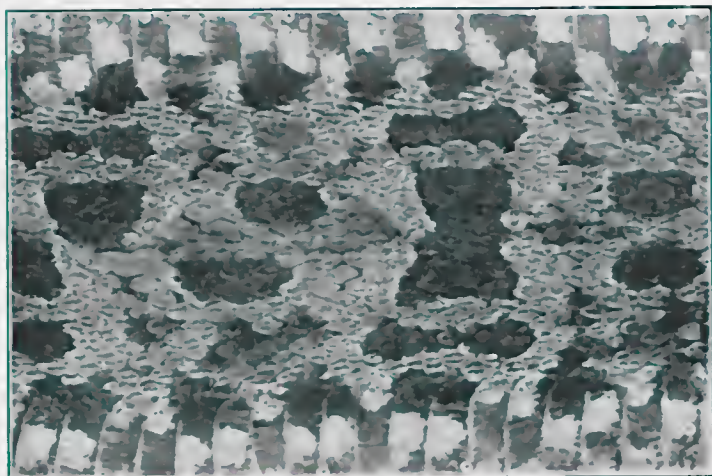



FIG. 2
Marcas dorsais dos adultos de *T. pradoi*

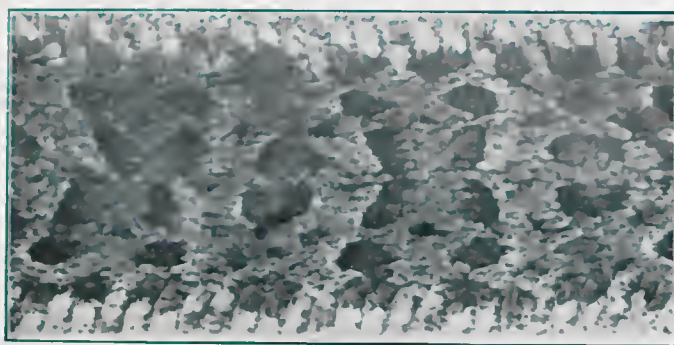



FIG. 3
Marcas dorsais dos jovens de *T. pradoi*

Dorsais em 25 séries; ventrais 203; caudais 59/59. Colorido e desenho iguais aos do holotipo porém as manchas ventrais um pouco mais claras (conservação ?).

| | |
|---|---|
| Comprimento total. | 845 mm |
| Cauda ........... | 110 mm |
| Cabeça .......... | 32,6 mm |

Mesma procedencia do que o holotipo.

*Paratipos.* ♂♂ No. 10.602, 10.605, 10.606, 10.608, 10.609, 10.610, 10.690 10.692 e 10.693

♀♀ No. 10.599, 10.600, 10.601, 10.607, 16.611, 10.687, 10,688, 10.689 e 10. 691. Todos na coleção do Instituto Butantan. Procedentes de Pau Gigante, Espirito Santo, Brasil.

*Marcas dorsais* — Dividimos as marcas dorsais em dois sistemas; um principal e um acessorio (fig. 4).

Sistema principal ....
- marcas paraventrais (D.)
- marcas laterais (A.)
- marcas marginais (B.)
- marca adicional (C.)

As marcas laterais consistem em duas manchas dispostas em triângulo nos jovens (fig.3 ), fundindo-se nos adultos (fig.2) de maneira a formar marcas trapezoidais, fundidas ou alternadas com ás do lado oposto. As marcas marginais consistem em duas manchas colocadas na base das laterais e formando com estas uma marca triangular.

Existe uma pequena mancha entre as laterais e as marginais (c.) que nos adultos funda-se as vêzes com as duas laterais.

As paraventrais consistem em uma série de manchas que se alternam com as marginais, ocupando a parte externa das ventrais, e a 1.ª e 2.ª série de dorsais, estendendo-se ao longo de todo o corpo.

Sistema acessorio ....
- marcas vertebrais (a.)
- marcas paraventrais (b.)
- marcas periféricas (c.)

Das marcas do sistema acessorio só duas são muito distintas, são as paraventrais, opostas ou alternadas. As outras manchas, vertebrais e periféricas circundam as paraventrais e são menos nitidas.

*Colorido* — O colorido geral é pardo cinzento não apresentando o aspecto aveludado que se observa em *T. atrox* (L). O ventre é largamente maculado de pardo cinzento (fig.5).

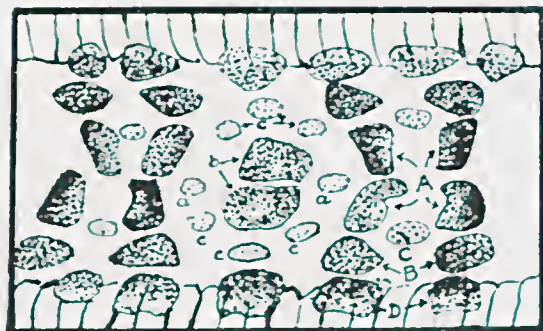



Fig. 4
Esquema das marcas dorsais em *T. pradoi*.

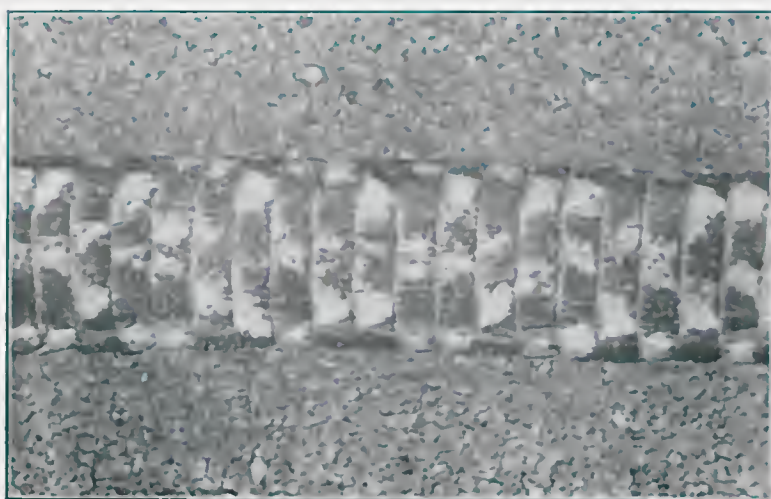



Fig. 5
Desenho ventral de *T. pradoi*

*Cabeça* — Estudando a regressão do comprimento da cabeça sôbre o comprimento do corpo graduamos uma reta de equação Y=3, 635 + 0, 0385 X com erro da estimativa = 1,008.

Parece-nos que *Trimeresurus pradoi* tenha cabeça menor que *Trimeresurus atrox* (graf. I); porem, infelizmente, a amostra de *T. atrox* da qual dispomos é extremamente heterogenea, tanto quanto a procedência quanto ao estado de conservação, não permitindo pois uma comparação satisfatória.

*Lista dos exemplares de* Trimeresurus pradoi.

| Número | Sexo | Compr. total mm. | Corpo mm. | Cauda mm. | Cabeça mm. | Escamas dorsais | Escamas ventrais | Escama anal | Escamas sub-caudais | Observações |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10603 | ♂ | 1110 | 970 | 140 | 39,3 | 25 | 203 | 1 | 63/65 | holotipo |
| 10694 | ♀ | 845 | 735 | 110 | 32,6 | 25 | 203 | 1 | 59/59 | alotipo |
| 10602 | ♂ | 970 | 830 | 140 | 35,3 | 23 | 193 | 1 | 65/65 | paratipo |
| 10605 | ♂ | 1030 | 880 | 150 | 38,1 | 25 | 196 | 1 | 67/67 | paratipo |
| 10606 | ♂ | 1010 | 875 | 140 | 36,3 | 25 | 198 | 1 | 69/69 | paratipo |
| 10608 | ♂ | 945 | 820 | 125 | 35,3 | 25 | 199 | 1 | 65/65 | paratipo |
| 10609 | ♂ | 790 | 675 | 115 | 28,7 | 23 | 194 | 1 | 66/66 | paratipo |
| 10610 | ♂ | 720 | 620 | 100 | ? | 23 | 191 | 1 | 60/60 | paratipo |
| 10690 | ♂ | 985 | 850 | 135 | 37,3 | 25 | 195 | 1 | 70/70 | paratipo |
| 10692 | ♂ | 875 | 765 | 110 | 32,6 | 25 | 200 | 1 | 56/56 | paratipo |
| 10693 | ♂ | 1040 | 905 | 135 | 37,8 | 25 | 194 | 1 | 63/63 | paratipo |
| 10599 | ♀ | 1025 | 900 | 125 | 40,3 | 25 | 198 | 1 | 59/59 | paratipo |
| 10600 | ♀ | 1145 | 1000 | 145 | 42,3 | 23 | 201 | 1 | 60/60 | paratipo |
| 10601 | ♀ | 1190 | 1035 | 155 | 44,4 | 25 | 197 | 1 | 60/60 | paratipo |
| 10607 | ♀ | 1150 | 1010 | 140 | 42,0 | 25 | 202 | 1 | 61/61 | paratipo |
| 10611 | ♀ | 980 | 855 | 125 | 35,0 | 25 | 205 | 1 | 61/61 | paratipo |
| 10687 | ♀ | 860 | 750 | 110 | 32,5 | 25 | 205 | 11 | 60/60 | paratipo |
| 10688 | ♀ | 910 | 800 | 110 | 35,0 | 25 | 201 | 1 | 57/57 | paratipo |
| 10689 | ♀ | 910 | 800 | 110 | 36,1 | 25 | 196 | 1 | 57/57 | paratipo |
| 10691 | ♀ | 925 | 815 | 110 | 34,4 | 25 | 207 | 11 | 57/57 | paratipo |

*Hemipenis* (fig. 6) — Dividido; cálices arredondados, profundos e franjados. Espinhos bem desenvolvidos sendo os da parte póstero-basilar maiores.

A zona com cálices parece ser maior do que em *T. atrox* e os cálices são mais profundos mesmo perto do ápice. Porem de maneira geral não se afasta muito do hemipenis de *T. atrox*.

*Escamas dorsais* — Em *Trimeresurus pradoi* as escamas dorsais variam entre 23 e 25 para os machos e fêmeas, enquanto na espécie próxima *T. atrox* elas variam

entre 23 e 33 sendo geralmente 25 nos machos (excepcionalmente 23) e 27 (excepcionalmente 33) nas fêmeas. Nos 20 exemplares de *Trimeresurus pradoi* as escamas dorsais distribuiam-se da seguinte maneira: Machos; 3 indivíduos com 23 séries e 7 com 25 séries; Fêmeas: 1 indivíduo com 23 séries e 9 com 25 séries.

Isto demonstra nítida predominância para o No. 25 e um dimorfismo sexual sem significação, ao contrário do que se observa no *atrox*.

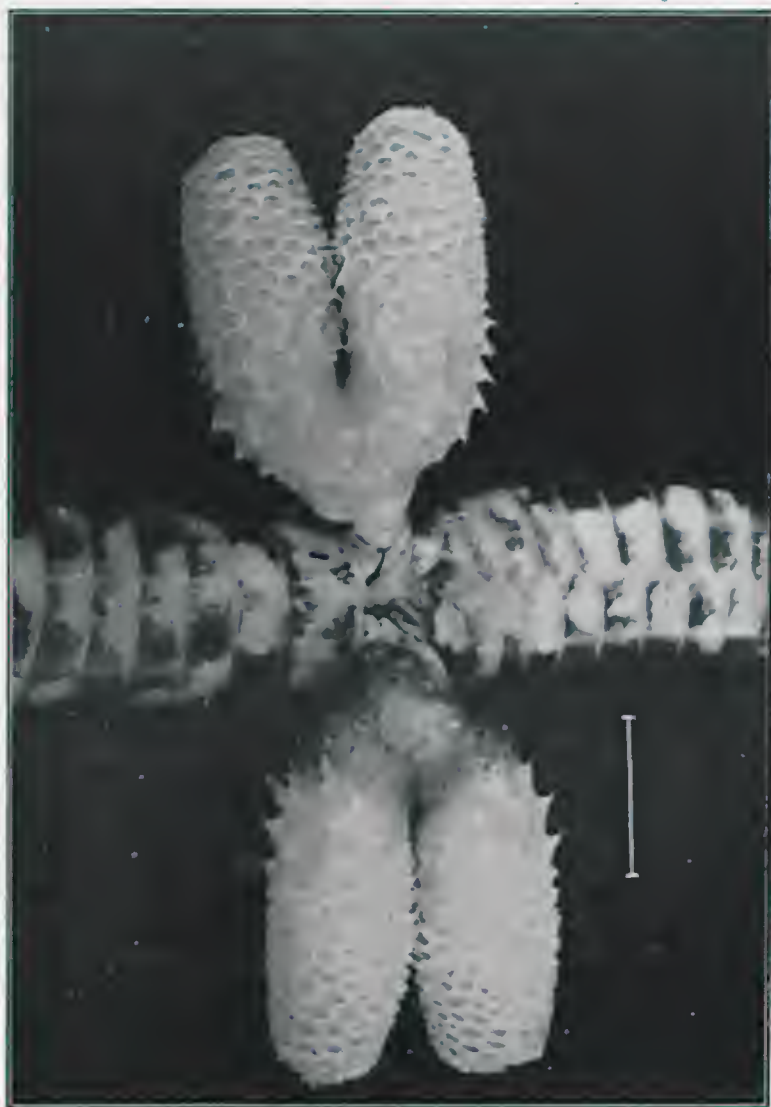
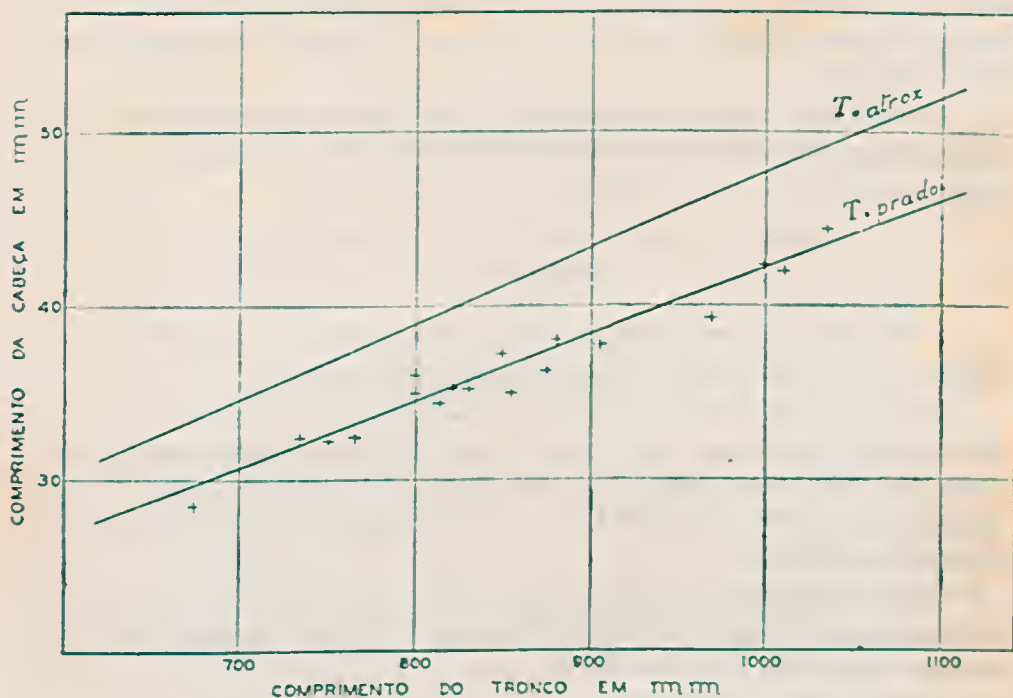



Fig. 6
Hemipenis de *T. pradoi*

*Ventrais* — As ventrais variam de 191 a 203 nos machos e 196 a 207 nas fêmeas.

*Anal* — Simples salvo no exemplar No. 10.687.

*Diagnose.* — Uma espécie de *Bothrops* próximo a *T. atrox* (L) do qual difere por ter uma cabeça menor, um corpo mais delgado, não apresentar dimorfismo sexual nas escamas dorsais, a placa supraocular mais alongada, pelo colorido e desenho completamente diferente.

*Escamas dorsais* 23-25, ventrais 191 a 207.

O colorido aproxima-se completamente do que se observa nas *T. neuwiedii.*

RESUMO

Uma nova espécie de *Trimeresurus*, *Trimeresurus pradoi*, oriunda dos arredores de Pau Gigante, Estado do Espírito Santo, Brasil é descrita. A nova espécie é próxima de *Trimeresurus atrox* (L) da qual se distingue por ter o corpo mais delgado; uma cabeça menor; supraocular mais alongado, ausência

de dimorfismo sexual no numero d'escamas dorsais, ventrais abundantemente maculadas de pardo-cinzento escuro e um colorido e desenho aproximando-se do das *T. neuwiedii*.

A ausência de formas intermediarias de um lado e a falta de *B. atrox* da região não permitem de resolver definitivamente si se trata de uma espécie ou de uma subspécie nova.


## ABSTRACT

Description of a new species of *Trimeresurus*, *"Trimeresurus pradoi"* which originates from Pau Gigante, State of Espirito Santo, Brazil.

The new species is nearest to *Trimeresurus atrox* (L), from which it can be distinguished by a slimmer body; smaller head; the more elongated supraoculars; absence of sexual dimorphism of the dorsal scales; ventral scales largely spotted with dark; a different pattern and colour not unlike that found in *Trimeresurus neuwiedii* subspecies.

The missing of intermediate forms as well as the absence of *B. atrox* in that region do not permit a definite conclusion, as to whether the sample described is a new especies or a new subspecies.



## ZUSAMMENFASSUNG

Beschreibung einer neuen *Trimeresurus* Species *"Trimeresurus pradoi"* Fundor Umgebung von Pau Gigante, Staat Espirito Santo, Brasilien.

Die neuse Species steht der *Trimeresurus atrox* nahe, von der sie sich durch folgende Merkmale unterscheidet: Kleinerer Kopf; schlankerer Rumpf; längere supraoculare Schuppen; fehlen des sexuellen Dimorphismus der Rücken-schuppen; reichliche grauschwarze Tüpfelung der Bauch seite; von ählicher Zeichnung wie sie bei der *Trimeresurus neuwiedii* zu finden ist.

Die mangelende Beobachtung von Zwischen-formen, sowie das Fehlen von *T. atrox* der erwähnten Gegend gestat keine entgültige Entscheidung ob die beschriebenen Exemplare einer neuen Species oder neuen Subspecies angehörem.


## BIBLIOGRAFIA


1. Amaral, A. do. — A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical Pit-vipers. Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. 2: 1925.
2. Linneu. — Syst. Nat., ed. 10, 1758, v. pp. 222.
3. Klauber, L. M. — A statistical study of the rattlesnakes 5, *Occasional Papers San Diego Soc. Nat. Hist.* 4:3, 1938.

# POTENCIAÇÃO DA AÇÃO VERMICIDA DO HEXYLRESORCINOL POR DETERGENTES.

## EXPERIÊNCIAS *IN VITRO* COM ASCARIS DE PORCO

POR F. W. EICHBAUM (*)

*(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

O efeito vermicida do Hexylresorcinol (Hr) é ativado em presença de detergentes aniônicos. Rogers, examinando a ação antihelmintica do Hexylresorcinol contra o *Nippostrongylus muris*, verificou um nitido efeito potenciador do oleato e laurato de sódio; a última substância era mais ativa que a primeira num pH de 6.5, fato este que o autor relaciona à maior atividade superficial do laurato. O efeito ativante dos detergentes sôbre o Hr. depende de uma concentração ótima dos sabões, sendo que pequenas doses (0.01 — 0.02%, do oleato) reforçam a atividade do Hr., doses médias (0.2-1%) inibim a sua ação e as doses acima de 1% têm já por si só um efeito vermicida. Estas observações estão de acôrdo com os achados anteriores de Trim e colaboradores que verificaram que doses baixas de oleato elevaram o grau de passagem do Hr. através da cutícula do *Ascaris lumbricoides*, enquanto que concentrações altas reduzem a permeabilidade. Estes trabalhos mostraram ainda "que o grau da penetração do Hr. está intimamente relacionado à atividade interfacial da mistura sabão - Hr. A tensão minima da mistura Hr. - sabão é nitidamente abaixo da tensão dos seus dois componentes, o que indica a formação de um complexo na interface".

O presente trabalho trata de experiências *in vitro* sôbre a ação ascaricida do Hr. em combinação com um maior número de detergentes. Incluimos entre êstes também vários derivados do óleo de cajú, cujo alto valor detergente e efeito vermicida foi demonstrado nas recentes publicações de Eichbaum, Leão e Eichbaum. Uma outra parte do trabalho visava estudar o efeito de cálcio sôbre o efeito ativante dos sabões. A presença dêste ion no intestino conduz à formação de sabões de cálcio pouco solúveis, o que modifica nitidamente o poder ativante

(*) Estagiario.

Recebido para publicação em 10-7-47.

dos detergentes, como conseguimos demonstrar também em nossas experiências *in vitro*.

A técnica das nossas experiências *in vitro* permite uma dosagem mais variada e exata dos vários reativos, obtendo-se os resutados de numerosas experiências num tempo relativamente curto; a deficiência dêstes testes reside principalmente no fato que não se leva em conta a complexidade dos fatores inibidores (muco, bile) ou favorecedores que podem interferir com a ação no intestino. Os resultados obtidos *in vitro* permitem, porisso, concluir só com reserva sôbre o provável efeito *in vivo*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Como material de experiência serviram áscaris de porco (*Ascaris lumbricoides* var. *suis*). Os vermes foram recolhidos dos intestinos de porcos recem-mortos e eram reunidos imediatamente numa garrafa termos; levados uma hora após ao laboratório, os vermes eram lavados em salina fisiológica a 37° e distribuidos em béqueres de 250 cm³. Estes foram colocados em estufa a 37°, onde permaneceram durante 3, no maximo 4 dias, com mudança diária da solução de salina.

TABELA I

*Influência do tempo de conservação sôbre a sensibilidade dos vermes ao Hexylresorcinol (*)*

| Tempo de conservação dos vermes | Quantidade de Hexylresorcinol por 100 cm³ de sol. de Tyrode | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 50 mg | | 25 mg | | 12.5 mg | | 5.0 mg | |
| | I | † | I | † | I | † | I | † |
| 24 horas | 19' | 41' | 27' | 55' | 84' | 20 h | 20 h | 20 h |
| 48 horas | 26' | 41' | 37' | 48' | 73' | 20 h | 20 h | 20 h |
| 72 horas | 18' | 49' | 29' | 71' | 74' | 20 h | 20 h | 20 h |
| 96 horas | 16' | 45' | 28' | 73' | 88' | 20 h | 20 h | 20 h |
| Média | 20' | 44' | 30' | 62' | 8[illegible]' | 20 h | 20 h | 20 h |

(*) — Os algarismos desta Tabela representam o valor médio de 4 diferentes séries de experiências realizadas (Sôbre a técnica exata destas experiências cf. abaixo.)

I — imobilidade espontânea

† — morte

Nestas condições os vermes conservam uma boa motilidade espontânea por 72-96 horas; também a sua sensibilidade ao Hexylresorcinol fica praticamente inalterada durante todo êste tempo (cf. Tab. I).

Nos testes da vermicidia *in vitro* comparava-se a atividade do Hr. em várias concentrações. 1.) com o poder vermicidia dos detergentes 2.) com a atividade de várias combinações de Hexylresorcinol + detergente.

Foram testadas as seguintes substâncias: (*)

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Hexylresorcinol ...................... | sol. alcoólica a 5 % |
| 2. | Anacardato de sódio .................. | sol. aquosa a 5 % |
| 3. | Fração anácida do óleo de cajú (**) ... | tintura alcoólica a 10% |
| 4. | Anacardol ............................ | tintura alcoólica a 10% |
| 5. | Óleo de Cajú (***) ................... | tintura alcoólica a 10% |
| 6. | Tetrahidro-anacardato de sódio ........ | sol. aquosa a 5% |
| 7. | Ricinoleato de sódio ................. | sol. aquosa a 5 % |
| 8. | Oleato de sódio ...................... | sol. aquosa a 5 % |
| 9. | Linoleato de sódio ................... | sol. aquosa a 1 e 2.5% |
| 10. | Stearato de sódio .................... | sol. aquosa a 1% |
| 11. | Palmitato de sódio ................... | sol. aquosa a 1% |

*No teste da vermicidia*, 4 exemplares de áscaris de tamanho aproximadamente igual foram colocados em 100 cm³ de água fisiológica a 0.85% e solução de Tyrode, respectivamente. Os líquidos eram contidos em béqueres de 250 cm³ de volume, mergulhados num banho maria com temperatura constante a 37 (Foto 1).

---

(*) A quantidade, em cm³, de cada droga usada nestes testes, correspondeu ao seu teor absoluto em mg: assim usaram-se de uma

| | |
|---|---|
| solução a 1% ... 5 cm³ | = 50 mg |
| solução a 5% ... 1 cm³ | |
| solução a 10% ... 0.5 cm³ | |

(**) Chamamos de "fração anácida" aquela parte do óleo de cajú que fica sobrando depos da precipitação do ácido anacárdico pelo hidróxido de chumbo. A fração anácida contém como componentes principais cardol e anacardol.

(***) Oleo de casca de cajú (cashew nutshell liquid).

Foto 1
Banho maria com parede anterior de vidro, permitindo a observação dos vermes durante a incubação.

Após alguns minutos de permanência a 37 graus, juntavam-se aos diversos béqueres as drogas em teste.

A solução de Tyrode, como meio de suspensão foi escolhido na segunda parte de nossas experiências por causa de sua maior semelhança aos líquidos do organismo e para estudar, em particular, a influência do Ca sôbre a suposta ação ativante dos detergentes.

Para avaliar a ação vermicida de diferentes substâncias e combinações foram escolhidos os seguintes critérios:

1. fim dos movimentos espontâneos = 1 } de todos os 4 vermes contidos num vidro
2. imobilidade total (morte) = + }

Foram considerados "mortos" aquêles vermes que depois da parada dos movimentos espontâneos não recuperaram a motilidade dentro de 30", quando re-suspensos numa solução pura de água fisiológica ou de solução de Tyrode. Os vermes que recuperaram motilidade sob estas condições foram recolocados na solução vermicida e as provas da "imobilidade total" foram repetidas em intervalos de 15 em 15 minutos, no máximo. O tempo de observação contínua extendeu-se no minimo a 4 horas. Uma segunda leitura final foi feita após 20 horas. Todos os vermes cuja morte ocorreu entre 4 e 20 horas foram registrados nas seguintes tabelas, como "mortos em 20h" os que sobreviveram mais de 20 horas como "morte ∞".

TABELA II

*Ação ascaricida in vitro do Hexylresorcinol, de detergentes e de combinações Hexylresorcinol + detergentes em água fisiológica a 0,85%*

*(Os mg indicam a quantidade total da droga adicionada a 100 cm³ de salina contendo 4 vermes)*

*HEXYLRESORCINOL*

| Detergente | | I | | II | | III | | IV | | V | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 50 mg | | 25 mg | | 12.5 mg | | 5.0 mg | | ⊝ mg | |
| | | I | I | + | + | I | + | I | + | I | + |
| NH₄ | | 20' | 39' | 30' | 54' | 62' | 20h(180') | 20 h | 20 h | — | — |
| Anacardato de sódio | 50 mg | 12' | 32' | 12' | 14' | 24' | 48' | 42' | 62' (20h) | 103' | 194' |
| | 25 mg | 15' | 60' | 14' | 20' | 28' | 51' | 33' | 61' | 20 h | 20 h |
| | 12.5 mg | 15' | 40' | 20' | 50' | 20' | 110' | 75' | 220' | — | — |
| Fração anacida | 50 mg | 15' | 40' | 15' | 55' | 21' | 64' | 30' | 115' | 20 h | 20 h |
| | 25 mg | 15' | 40' | 15' | 60' | 40' | 45' | 30' | 135' | 20 h | 20 h |
| | 12.5 mg | 25' | 45' | 25' | 55' | 35' | 55' | 75' | 220' | — | — |
| Anacardol | 50 mg | 20' | 35' | 20' | 55' | 25' | 55' | 70' (20h) | 135' (20h) | ∞ | ∞ |
| | 25 mg | 20' | 35' | 20' | 55' | 60' | 100' | 195' (20h) | 20 h | — | — |
| | 12.5 mg | 25' | 35' | 15' | 55' | 60' | 130' | 195' | 20 h | — | — |
| Óleo de cajú | 50 mg | 27' | 58' | 35' | 65' | 23' | 93' | 53' | 112' | ∞ | 20h (212') |
| | 25 mg | 17' | 53' | 23' | 63' | 50' | 95' | 73' | 208' | ∞ | — |
| | 12.5 mg | 17' | 50' | 17' | 75' | 53' | 155' | 68' | 105' (20h) | — | — |
| Oleato de sódio | 50 mg | 15' | 60' | 25' | 71' | 20' | 105' | 20 h | 20 h | ∞ | ∞ |
| | 25 mg | 20' | 70' | 17' | 53' | 20' | 90' | ∞ | ∞ | — | — |
| | 12.5 mg | 20' | 55' | 25' | 90' | 90' | 105' | ∞ | ∞ | — | — |
| Linoleato de sódio | 50 mg | 20' | 65' | 20' | 75' | 20' | 105' | 75' | 115' | — | — |
| | 25 mg | 15' | 35' | 55' | 60' | 55' | 85' | 55' | 110' | — | — |
| | 12.5 mg | 15' | 30' | 25' | 45' | 45' | 85' | 85' | 20 h | ∞ | — |
| Ricinoleato de sódio | 50 mg | 25' | 70' | 30' | 55' | 30' | 70' | 20 h | 20 h | | — |
| | 25 mg | 15' | 45' | 20' | 25' | 52' | 101' | ∞ | ∞ | ∞ | 165' |
| | 12.5 mg | 20' | 45' | 20' | 130' | 51' | 85' | ∞ | ∞ | — | — |

+ = morte
I = imobilidade espontanea

### Tabela III

*Ação ascaracida* in vitro *de Hexylresorcinol, de detergentes e de combinações Hexylresorcinol + detergentes*

*(Os mg indicam a quantidade total da droga adicionada a 100 cm³ de solução de Tyrode)*

*HEXYLRESORCINOL*

| Detergente | | I | | II | | III | | IV | | V | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 50 mg | | 25 mg | | 12.5 mg | | 5.0 mg | | O mg | |
| | | I | + | I | + | I | + | I | + | I | + |
| Nil | | 20' | 44' | 30' | 61' | 80' | 20 h | 20 h | 20 h | — | — |
| Anacardato de sódio | 50 mg | 17' | 33' | 37' | 65' | 55' | 127' | 20 h | 20 h | 20h (∞) | 20h (∞) |
| | 25 mg | 15' | 35' | 50' | 102' | 45' | 161' | 97' (20h) | 217' (20h) | — | — |
| | 12.5 mg | 30' | 55' | 32' | 80' | 65' | 215' | 135' | 20 h | — | — |
| Fração anácida | 50 mg | 20' | 30' | 20' | 62' | 22' | 75' | 56' | 190' | 20h (∞) | 20h (∞) |
| | 25 mg | 20' | 45 | 20' | 62' | 23' | 121' | 95' | 20 h | ∞ | ∞ |
| | 12.5 mg | 30' | 55' | 20' | 62' | 25' | 80' | 95' | 20 h | — | — |
| Anacardol | 50 mg | 18' | 23' | 22' | 52' | 26' | 98' | 50' (20h) | 175' (20h) | 20h (∞) | 20h (∞) |
| | 25 mg | 25' | 50' | 22' | 50' | 41' | 131' | 20 h | 20 h | — | — |
| | 12.5 mg | 25' | 55' | 22' | 57' | 40' | 145' | 20 h | 20 h | — | — |
| Óleo de cajú | 50 mg | 15' | 45' | 30' | 62' | 45' | 97' | 105' | 20 h | 20h (∞) | 20h (∞) |
| | 25 mg | 15' | 55' | 30' | 67' | 35' | 117' | 82' (20h) | 20 h | ∞ | ∞ |
| | 12.5 mg | 15' | 55' | 30' | 85' | 35' | 257' | 85' (20h) | 20 h | — | — |
| Ricinoleato de sódio | 50 mg | 16' | 55' | 37' | 115' | 78' | 20h(150') | 20h (20') | 20h (200') | ∞ | ∞ |
| | 25 mg | 18' | 43' | 20' | 88' | 91' | 157'(20h) | 20 h | 20h (200') | — | — |
| | 12.5 mg | 18' | 50' | 51' | 123' | 160' | 20h(215') | 20 h | 20 h | — | — |
| Oleato de sódio | 50 mg | 25' | 39' | 30' | 65' | 105' | 20 h | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ |
| | 25 mg | 25' | 50' | 30' | 65' | 65' | 20 h | ∞ | ∞ | — | — |
| | 12.5 mg | 25' | 65' | 30' | 95' | 60' | 20 h | ∞ | ∞ | — | — |
| Linoleato de sódio | 50 mg | 13' | 40' | 25' | 107' | 55' | 20 h | 20h (175') | 20 h | ∞ | ∞ |
| | 25 mg | 18 | 57' | 28' | 96'(20h) | 53' (20h) | 20 h | 20 h | 20 h | — | — |
| | 12.5 mg | 22' | 57' | 30' | 118'(20h) | 75' | 20 h | 20h (105') | 20 h | — | — |
| Tetrahidro anacardato de sódio | 50 mg | 30' | 60' | 32' | 60' | 160' | 20 h | 120' | 20 h | ∞ | ∞ |
| | 25 mg | 25' | 45' | 30' | 70' | 35' | 20 h | (240'?) | ∞ | ∞ | ∞ |
| | 12.5 mg | 25' | 50' | 25' | 60' | 55' | 20 h | 120' | ∞ | ∞ | ∞ |

+ = morte
I = imobilidade espontanea

Todos os testes foram executados repetidas vêzes (3 até 4 e mais vêzes) com vermes de 24, 48, 72, raramente de 96 horas de conservação. Em cada experiência foi incluido um contrôle com Hexylresorcinol (em várias concentrações) para verificar a sensibilidade dos vermes no respectivo dia. Os algarismos marcados nas Tabelas II e III, representam os valores médios das diversas experiências.

## RESULTADOS

### A — *Ação vermicida do Hexylresorcinol, de detergentes e de combinações Hexylresorcinol + detergentes em água fisiológica a 0.85% e em Solução de Tyrode*

(cf. Tab. II e III)

Não foram incluidos nestas Tabelas os contrôles de vermes suspensos em água fisiológica, os quais mantiveram uma boa motilidade espontânea por mais de 20 horas; um resultado igual foi obtido nos vidros, aos quais se juntaram 1 ou 2 cm³ de álcool/100 cm³ de água fisiológica, (*) para controlar uma eventual influência do álcool nas tinturas de anacardol Ol. de cajú, etc. Nem foram reproduzidos os resultados das experiências com stearato e palmitato de sódio, que em nenhuma das concentrações usadas (6.25 — 50 mg/100 cm³ NaCl.) (*) mostraram qualquer atividade vermicida intrinsica ou ação potenciadora sôbre o poder anti-helmintico do hexylresorcinol. Nas tabelas, os valores em parentesis indicam resultados discordantes numa série de experiências. Tôdas as discordâncias foram encontradas só nas diluições mais altas do Hexylresorcinol, enquanto que nas concentrações médias e fortes os resultados foram bem regulares (**)

#### 1. *Experiências em água fisiológica* (Tabela II)

O anacardato de sódio, em quantidades de 50 mg/100 cm³ NaCl fisiol. (=0.5 mg/cm³) possui uma ação ascaricida intrinsica, causando uma "imobilidade espontânea" dos vermes em ± 100', a morte em cerca de 3 horas. O efeito potenciador do anacardato de sódio sobre o poder vermicida do Hexylresorcinol manifesta-se da maneira mais nitida, quando se combinam doses fracamentes ativas do Hr. (5. 0-12.5 mg) com várias concentrações do anacardato (cf.

---

(*) Ou solução de Tyrode.

(**) Quando, por exemplo, os resultados de 5 observações em dias diferentes eram os seguintes: Morte depois de 170', 190', 220' 20h, tiramos a media dos 3 primeiros valores (= 193'), juntando em parentese "(20h)"; quando as mortalidades de 20h eram mais frequentes escrevemos "20h (193')".

coluna IIIe IV na tabela II). Assim, por exemplo, 12.5 mg de Hexylresorcinol imobilizam os vermes em 62′ e matam-os em 20 horas; quando combinados com 25 mg de Anacardato de sódio (o qual por si só imobiliza os vermes apenas depois de 20 horas) os vermes ficam imóveis já depois de 28′ e morrem depois de 51′. Com as doses maiores de Hexylresorcinol (25-50 mg), altamente ativas, as diferenças no poder vermicida do Hexylresorcinol só e do Hexylresorcinol combinado com Anacardato sódico são menos impressionantes. Um aspecto semelhante oferecem também o óleo de cajú e seus derivados, a fração anácida e o anacordol. Nota-se com todos êstes compostos (inclusive o anadarto de sódio) um ligeiro efeito inibidor sôbre o poder vermicida do Hr., que se manifesta, aliás, unicamente quando se combinam certas concentrações dos detergentes com as doses mais altas (25-50 mg) de Hexylresorcinol. Esta inibição se refere exclusivamente à imobilidade absoluta (morte), enquanto que quase todos os valores da imobilidade espontânea indicam também nestes casos uma ação reforçada. A inibição pelo ricinoleato, oleato e linoleato de sódio fica mais nitida quando estes compostos são combinados com altas doses de Hr., verificando-se mais uma vez também com estas drogas um efeito nitidamente ativador sôbre as doses baixas e pouco ativas de Hexylresorcinol (5.0-12.5 mg). Entre estas três últimas

TABELA IV

| Agua fisiol. | Hexylresorcinol Sol. alcool. a 5% | Detergente | pH | Poder ativador do detergente |
|---|---|---|---|---|
| $cm^3$ | | | | |
| 50 | — | — | 6.4 | — |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Ricinoleato de sódio 5% $0.25\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 7.1 | + + |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Oleato de sódio 5% $0.25\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 7.5 | ++ — +++ |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Linoleato de sódio 1% $1.25\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 6.8 | + + |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Anacardato de sódio 5% $0.25\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 6.75 | + + + |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Palmitato de sódio 1% $1.25\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 7.9 | ⊖ |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Stearato de sódio 1% $1.25\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 7.5 | ⊖ |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Tintura de óleo de cajú 10% $0.125\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 5.8 | ++ — — ++ |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Tintura anácida 10% $0.125\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 6.2 | ++ — — ++ |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | Tintura de anacardol 10% $0.125\ cm^3 = 12.5\ mg$ | 6.3 | + + |
| 50 | $0.25cm^3 = 12.5mg$ | — | 6.3 | — |

drogas o oleato de sódio tem o efeito potenciador mais forte; ricinoleato, oleato, linoleato de sódio não têm atividade vermicida intrinsica, nas doses empregadas.

O poder ativador dos detergentes sôbre a ação vermicida do Hexylresorcinol não tem relação ao pH das diferentes soluções, como resulta da Tabela IV.

2. *Experiências em solução de Tyrode* (Tabela III).

Em contraste com os resultados das experiências em água fisiológica, o anacardato de sódio em solução de Tyrode não possui mais atividade vermicida. A fração anácida, anacardol e o óleo de cajú retêm ainda uma ação vermicida muito fraca. Nota-se que o anacardato sofre uma precipitação forte no meio de Tyrode pela formação de sais de Ca e de Mg, o óleo de cajú uma precipitação ligeira, a fração anácida e o anacardol não são praticamente alterados.

O anacardato de sódio tem um efeito ligeiramente inibidor sôbre doses médias de Hexylresorcinol (25 mg) e nitidamente ativador sôbre doses menores 12.5 não se notando ação nitida em combinação com doses mais fracas de 5.0 mg de Hr. De maneira semelhante comportam-se o anacardol e o óleo de cajú que talvez possuam um poder ativador algo maior. O tetrahydro-anacardato de sódio, em solução de Tyrode inibe ligeiramente as altas doses de Hr., ativando-o muito pouco nas diluições maiores (*)

Uma ação potenciadora bem nitida em tôdas as combinações com Hr. possui a fração anácida (cf. colunas III e IV Tabela III), notando-se também aqui, como nos demais detergentes, um aumento de todos os valores em relação aos obtidos em meio salino.

Ricinoleato, linoleato, stearato e palmitato de sódio formam em sol. de Tyrode um forte precipitado de sais de Ca e de Mg perdendo, assim, qualquer efeito ativador sôbre o poder vermicida do Hexylresorcinol.

B — *Ação sinergista do Anacardato de sódio e da fração anácida.*

Na primeira parte dêste trabalho ficou demonstrado que os vários derivados do óleo de cajú (como o ácido anacárdico, anacardol, a fração anácida) têm um efeito ativador sôbre a ação vermicida do Hexylresorcinol; estas substâncias possuem por si mesmas um certo efeito vermicida intrínsico que é mais pronunciado no ácido anacárdico (resp. no anacardato sódico) e no óleo de cajú, quando estas substâncias são testadas em meio isento de cálcio.

---

(*) Por falta de quantidades suficientes desta droga fizemos os respectivos testes só em meio de Tyrode, com omissão das provas em NaCl fisiol.

TABELA V

*Ação sinergista do Anacardato de sódio e da fração anácida*
*Experiência em água fisiológica (*)*

| Substância combinada | Na anacard. 200 mg | | Na anacard. 100 mg | | Na anacard. 50 mg | | Na anacard. 25 mg | | — | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | + | I | + | I | + | I | + | I | + |
| Nil | 55' | 155' | 98' | 275' | 127' | 338' | 290' | ∞ | — | — |
| Fração anácida 200 mg | — | — | — | — | — | — | — | — | 225' | 20 h |
| 100 mg | — | — | 65' | 270' | 65' | 322' | 70' | 285' | 455' | 20 h |
| 50 mg | — | — | 77' | 170' | 62' | 352' | 85' | 20 h | 455' | 20 h |
| 25 mg | — | — | 67' | 155' | 87' | 320'[20h] | 85' | 20 h | 20 h | 20 h |
| Óleo de cajú 200 mg | | | | | | | | | 90' | 190' |
| 100 mg | | | | | | | | | 115' | 20 h |
| 50 mg | | | | | | | | | 150' | 20 h |
| 25 mg | | | | | | | | | 20 h | 20 h |

(*) Tôdas as mortes que ocorreram entre 7½ e 20 horas são registradas como "(+) 20 h";
I = inobilidade espontânea
+ = morte

TABELA VI

*Ação sinergista do Anacardato de sódio e da fração anácida*
*Experiência em Solução de Tyrode (*)*

| Substância combinada | Na anacard 200 mg | | Na anacard. 100 mg | | Na anacard. 50 mg | | Na anacard. 25 mg | | — | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | + | I | + | I | + | I | + | I | + |
| Nil | 20 h | ∞ | 20 h | ∞ | 20 h | ∞ | 20 h | ∞ | — | — |
| Fração anácida 200 mg | — | — | — | — | — | — | — | — | 20 h | 20 h |
| 100 mg | — | — | 185' | 20 h | 200' | 20 h | 200' | ∞ | 20 h | 20 h |
| 50 mg | — | — | 185' | 20 h | 120' | 20 h | 20 h | 20 h | 20 h | ∞ |
| 25 mg | — | — | 335' | ∞ | 235' | 335' | 20 h | ∞ | 20 h | ∞ |
| Óleo de cajú 200 mg | | | | | | | | | 20 h | 20 h |
| 100 mg | | | | | | | | | 20 h | 20 h |
| 50 mg | | | | | | | | | 20 h | ∞ |
| 25 mg | | | | | | | | | 20 h | ∞ |

(*) Tôdas as mortes que ocorreram entre 6½ e 20 horas foram marcadas como "(+) 20 h";

∞ = morte em > 20 h.
I = imobilidade espontânea
+ = morte

Interessava ainda saber si os vários componentes do óleo de cajú — que é constituido de quantidade variáveis de ácido anacárdico (50-90%) e da fração anácida (cardol + anacardol) — têm entre si mesmos um efeito sinergista.

A Tabela V, que registra os resultados obtidos em meio salino, mostra uma nítida supremacia da mistura artificial de doses equilibradas do anacardato de sódio + fração anácida, em comparação com doses correspondentes de óleo de cajú. Assim imobilizam 25 mg de Na anacardato + 25 mg da fração anácida os vermes em 85′, enquanto que 50 mg de óleo de cajú produzem o mesmo efeito só depois de 150′.

A ação sinergista do anacardato de sódio + fração anácida fica ainda mais nítida em sol. de Tyrode (Tabela VI); neste meio o anacardato é desprovido de qualquer ação vermicida intrínsica, a fração anácida e o óleo de cajú possuem-na só num grau muito reduzido. A combinação de anacardato e da fração anácida, porém, revela uma atividade superior, não somente àquela de seus dois componentes, como também à do óleo de cajú.

Conclui-se disso que a mistura natural de ácido anacárdico e da fração anácida, como se encontram no óleo bruto, ainda não representa a relação ótima de seus componentes, quanto ao efeito vermicida. U'a mistura artificial de seus dois componentes em proporções equilibradas alcança um efeito nitidamente superior.

### C — *Influência de muco sôbre a atividade vermicida do Hexylresorcinol e de combinações Hexylresorcinol + detergentes.*

O muco exerce um nítido efeito inibidor sôbre o poder anti-helmíntico do Hexylresorcinol (Rogers).

Para verificarmos si a adição de um detergente ao Hexylresorcinol é capaz de vencer esta inibição, realizamos uma série de experiências em que juntamos um muco vegetal (de um Hibisco, vulgo "Quiabo"), na proporção de cerca de 0.5% à solução de Tyrode. Fóra disso, a técnica destas experiências correspondeu à descrita anteriormente.

Comparava-se nestas experiências a atividade vermicida do Hexylresorcinol só com o poder antihelmintico do Hr. associado à fração anácida.

A próxima Tabela VII é uma condensação de várias experiências dêste tipo, em meio de Tyrode.

TABELA VII

| | I | † | |
|---|---|---|---|
| 1. Hexylresorcinol 25 mg | 23' | 75' | I = imobilidade espontânea |
| 2. Hexylresorcinol 25 mg + muco | 38' | 110' | † = morte |
| 3. Fração anácida 50 mg | 20 h | ∞ | |
| 4. Fração anácida 50 mg + muco | 20 h | ∞ | |
| 5. Hexylresorcinol 25 mg + Fração anácida 50 mg | 20' | 78' | |
| 6. Hexylresorcinol 25 mg + muco + fração anácida 50 mg | 30' | 88' | |

*Conclusões*: a) o muco diminui a ação vermicida do Hexylresorcinol b) nas doses empregadas a fração anácida não revela efeito ativador sôbre o Hexylresorcinol; c) a presença de muco pouco enfraquece a atividade das combinações Hexylresorcinol + fração anácida: a associação destas duas drogas em meio mucoso, produz um efeito mais forte do que o Hexylresorcinol em meio mucoso (Tubo 2). Resultados análogos foram obtidos nas misturas de Hexylresorcinol com tintura de óleo de cajú.

RESUMO

1.º) O presente trabalho confirma os resultados de Trim e Rogers que demonstraram uma ativação do efeito vermicida de Hexylresorcinol por detergentes. Este efeito ativador depende de certas relações quantitativas, verificando-se que a combinação de altas doses do detergente com altas doses de Hexylresorcinol causa em certos casos uma ligeira inibição do efeito anti-helmíntico (do Hexylresorcinol), enquanto que doses baixas, quase inativas desta droga são fortemente ativadas pelos detergentes em várias concentrações.

Em meio salino o óleo de cajú (sob forma de tintura), como também os seus derivados: o anacardato de sódio, o anacardol, a "fração anácida" (composta de u'a mistura cardol + anacardol) revelaram um alto efeito potenciador sôbre o Hexylresorcinol. Entre todos os detergentes testados o anacardato e a fração anácida possuiram o efeito ativante mais pronunciado. A ação potenciadora do óleo de cajú e a do anacardol era aproximadamente igual a ação do oleato de sódio; o linoleato e o ricinoleato de sódio mostraram-se algo menos ativos. O palmitato e o stearato de sódio praticamente não influiram sôbre a ação vermicida do Hexylresorcinol. Nota-se ainda que o anacardato e o óleo

de cajú possuem um nitido efeito vermicida intrínsico. a fração anácida e o anacardol só em grau muito diminuido.

A atividade vermicida do Hexylresorcinol em meio salino e em solução de Tyrode não mostra diferenças significantes; por outro lado o oleato, o ricinoleato e o linoleato de sódio são precipitados neste meio como sais de cálcio e magnésio e perdem com isso quase completamente a sua ação potenciadora.

Contrário a isso, o anacardato de sódio, que fica também precipitado em meio de Tyrode continúa exercendo um nitido efeito potenciador, apesar do fato desta substância perder completamente o seu efeito vermicida intrinsico. A fração anácida, em meio de Tyrode, age ainda mais forte do que o anacardato: a tintura de óleo de cajú e o anacardol tem um efeito aproximadamente igual ao anacardato. O tetrahidro-anacardato de sódio tem um efeito ativador muito fraco.

Para compreender a diferença entre os sabões dos ácidos graxos, que são inativados em meio de Tyrode, e os derivados de óleo de cajú, que mantêm uma certa atividade convem lembrar das fórmulas que mostram no ácido anacárdico

COOH
$C_{15}H_{27}$ — OH

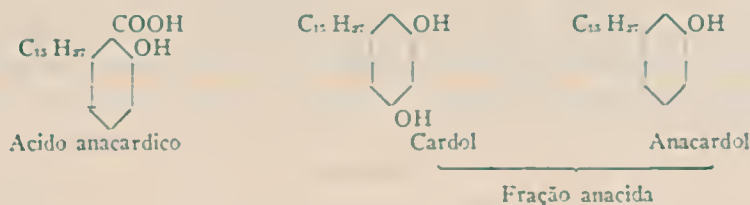
Acido anacardico

$C_{15}H_{27}$ — OH
OH

Cardol

$C_{15}H_{27}$ — OH

Anacardol

Fração anacida

2 grupos hidrofílicos (um carboxilico e um fenólico), no cardol e anacardol, dois e um grupo fenólico, respectivamente.

Aparentemente o grupo fenólico é só pouco desionizado no meio de Tyrode, garantindo desta maneira a persistência da ação potenciadora sôbre o poder vermicida do Hexylresorcinol. Na fração anácida que é a mais rica em grupos fenólicos êste efeito ativador (em meio de Tyrode) é melhor conservado.

2) Confirma-se a observação de Rogers relativa a ação inibidora de muco sôbre o poder anti-helmintico de Hexylresorcinol. A combinação de Hexylresorcinol + detergente (fração anácida, óleo de cajú), em meio mucoso, tem uma atividade só ligeiramente diminuida.

3) A combinação de doses inativas de anacardato de sódio com doses fracamente ativas da fração anácida, em meio de Tyrode, produz um efeito sinergista, manifestando-se por um poder vermicida mais nitido. Isso talvez indique de novo a importância dos grupos fenólicos na ativação de certos anti-helmínticos.

O óleo de cajú crú, que é constituido de u'a mistura "natural" de ácido anacárdico e da fração anácida, não representa o "ótimo" possível quanto à sua atividade vermicida; u'a mistura artificial de seus dois componentes em proporções equilibradas alcança um efeito vermicida nitidamente superior.

ABSTRACT

This paper confirms the findings of Trim et al., and Rogers concerning the activating potency of anionic detergents upon the vermicidal activity of Hexylresorcinol. This activating effect depends on certain quantitative relations between detergents and Hexylresorcinol, since the combination of high dosis of Hexylresorcinol with high doses of detergents produces, in some instances, a certain inhibition of the vermicidal effect, whereas medium or small doses of Hexylresorcinol, which are practically devoid of any vermicidal power, are strongly activated in presence of detergents at various concentrations.

Tincture of Cashew nut shell oil, as well as its derivatives: sodium anacardate, anacardol and a mixture of cardol + anacardol (="anacid fraction") display a high potenciating effect on Hexylresorcinol, when tested against Ascarids suspended in saline solution. Sodium anacardate and the "anacid fraction" are somewhat more active than the two other mentioned substances.

The potenciating effect of cashew nut oil and anacardol was about the same as that of sodium oleate; sodium ricinoleate and sodium linoleate were slightly less active, when combined with Hexylresorcinol in high dilutions, sodium palmitate and sodium stearate practically did not modify the vermicidal activity of Hexylresorcinol.

Sodium anacardate and cashew nut oil possess a fairly strong, intrinsic vermicidal power, anacardol and the anacid fraction only to a very limited extent.

In Tyrode's solution, which contains Calcium and Magnesium ions, the simple soaps (Na oleate, ricinoleate, linoleate) are deprived of any potenciating affect on Hexylresorcinol, due to the formation of unsoluble Ca and Mg salts. On the contrary, cashew nut oil and its subproducts retain their potentiating effect, although to a lesser degree than in physiologic saline solution. Among these substances, the potenciating effect of the anacid fraction was the most pronounced; cashew nut oil, sodium anacardate have a somewhat lower activating effect on the vermicidal power of Hexylresorcinol, in a Ca containing medium.

In Tyrode's solution, sodium anacardate is practically devoid of any intrinsic vermicidal activity, whereas anacardol, the anacid fraction and cashew nut oil retain still a slight vermicidal power. The persistence of the activating influence of Na anacardate, anacardol, cashew nut oil and the anacid fraction, even in a Ca containing medium, is probably related to the presence of non-desionized free phenol groups; consequently the two substances that contain the highest number of free phenol groups sc. the anacid fraction and cashew nut oil possess the highest activating influence on Hexylresorcinol in Tyrodes solution.

2. Rogers' observation that mucus inhibits the anthelmintic activity of Hexylresorcinol is confirmed. The vermicidal power of a combination of Hexylresorcinol with detergents (anacid fraction, cashew oil) is only slightly reduced in a mucus containing medium.

3. Inactive doses of Sodium anacardate when combined with inactive doses of the anacid fraction, in Tyrode's medium, produce, by a synergistic mechanism, a distinct vermicidal effect. This points once more to the possible importance of the phenolic groups for the enhancement of the vermicidal activity.

Crude cashew nut oil which consists of a natural mixture of anacardic acid + the anacid fraction, possesses only a slight vermicidal activity in Tyrode's solution; the natural proportion of its both constituents does not represent the "possible optimum" as to the vermicidal activity; an artificial mixture of both components in equilibrated proportions achieves a much higher vermicidal effect.

All experiments refered to in this abstract were perfomed on ascarids (*Ascaris lumbricoides* var. suis).

## BIBLIOGRAFIA

1. *Eichbaum, F. W.* — Biological properties of Anacardic acid (o-penta decadienyl salicylic acid) and related compounds. *Mem. Inst Butantan*, **19**:69-134, 1946.

2. *Leão, A. T. & Eichbaum, F. W.* — Ação vermicida do óleo de cajú e derivados (experiências em cães). *Mem. Inst. Butantan*, 1947, em publicação.

3. *Rogers, W. P.* — Studies on the anthelmintic activity of hexylresorcinol and tetrachlorethylene. *Parasitology*, **63**:98, 1944.

4. *Trim, A. R.* — Experiments on the mode of action of Hexylresorcinol as an anthelmintic. *Parasitology*, 35:209, 1943.

5. *Trim, A. R. & Alexander, A. E.* — Effect of soaps and synthetic wetting agents upon biological activity of phenols. *Nature*, **154**:177, 1944.

Mem. Inst. Butantan.
20:219-226, Dez.º 1947.



# OVÁRIO E ADRENAL. SUAS RELAÇÕES COM A ALIMENTAÇÃO E COM O BENZOATO DE ESTRADIOL

POR L. MILLER DE PAIVA

*(Do Laboratório de Endocrinologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

O ovário, como toda a glândula de secreção interna, reflete o estado funcional do organismo. Já se sabe de longa data que existem distúrbios ovarianos consequentes a distúrbios gerais, como acontece nas infecções graves, nos estados caquéticos, na insuficiência supra-renal, etc.

A inter-relação das adrenais com as gônadas tem sido salientada pelos seguintes fatos: as corticoesteronas e os hormônios sexuais possuem a mesma estrutura química; os animais grávidos resistem melhor a adrenalectomia; a progesterona mantem em vida o adrenalectomizado; na gravidez a cortex aumenta de volume; o periodo inter-menstrual humano se encurta com a administração de desoxicorticoesterona; os extratos corticais produzem a maturidade sexual precoce; as anomalias sexuais produzidas por tumores corticais e ainda a mesma origem embrionária dessas duas glândulas acentúam as relações entre si.

Em 1928, Lyman (1) observou que a adrenalectomia, em ratas brancas, fazia suprimir o ciclo estral. Del Castillo (2) observou sòmente um alongamento dos ciclos (6 e 7 dias) e achou que a supressão era consequência do mau estado geral dos animais, pois quase todos êles morriam poucos dias após a operação. As ratas viviam um mês e até um ano quando apresentavam adrenais acessorias.

Em consequência desses resultados e devido aos trabalhos recentes (3, 4, 5) sôbre a manutença em vida de animais adrenoprivos e sôbre a restauração da função gonadotrópica pela dieta cloretada, fomos induzidos a estudar a função ovariana em relação á adrenal. É nossa intenção pois, neste trabalho, mostrar como se comporta o ciclo estral em relação com a adrenalectomia uni e bilateral, com a alimentação rica e pobre em cloretos, assim como com a sensibilização das células queratinizadas ao benzoato de estradiol, também em relação á alimentação.

Recebido para publicação em 17-7-47.

## MATERIAL E MÉTODOS

Empregamos neste trabalho 48 ratas adultas, repartidas em 4 lotes:

A) 23 com adrenalectomia bilateral.

B) 10 com adrenalectomia unilateral.

C) 5 castradas-adrenalectomizadas e injetadas com Benzoato de Estradiol.

D) 10 castradas e injetadas com Benzoato de Estradiol.

Nos 3 primeiros grupos a alimentação variou periódicamente na quantidade de cloretos. Em todos os lotes fazíamos esfregaços diários pelo método clássico. Utilizavamos para isso uma pequena alça de arame fino e torcido, retiravamos o conteúdo vaginal e fazíamos um esfregaço em lâminas que era corada pela hematoxilina eosina e logo em seguida levada ao microscópio para a leitura.

As ratas eram pesadas de dois em dois dias. Ficavam em dieta rica em cloretos (+) durante 30 a 35 dias, sendo que no primeiro dia, sofriam adrenalectomia unilateral ou bilateral.

Em um segundo período, usavamos o regime para adrenoprivos (dieta pobre em cloretos) (++) e com êle permaneciam de 22 a 32 dias, para retornarem a dieta do reforço, rica em cloretos. Em 15 ratas, primeiro deixámos em dieta pobre de cloretos, depois rica e finalmente pobre em cloretos.

Em todos esses períodos os esfregaços vaginais eram feitos diáriamente e as ratas pesadas de dois em dois dias. Nas ratas castradas injetavamos Benzoato de Estradiol em dóse de 10 U. I. diárias. As leituras dos esfregaços e do pêso corporal foram transportadas nos gráficos numerados.

---

(++) DIETA DE ADRENOPRIVOS POBRE EM CLORETOS

| | |
|---|---|
| Fubá | 67% |
| Farinha de alfafa | 10% |
| Farinha de carne | 10% |
| Óleo de cação | 5% |
| Caseina | 5% |
| Fermento de cerveja | 3% |

(+) DIETA RICA EM CLORETOS

| | |
|---|---|
| Fubá | 65% |
| Farinha de alfafa | 10% |
| Farinha de carne | 10% |
| Caseina | 4% |
| Fermento de cerveja em pó | 2% |
| Mistura de sais (sal de cozinha 20g., lactato de cálcio 8., carbonato de magnésio 8g., cit. ferro 2g., Lugol 10g., farinha de osso 2Kg. | 4% |

GRAFICO I

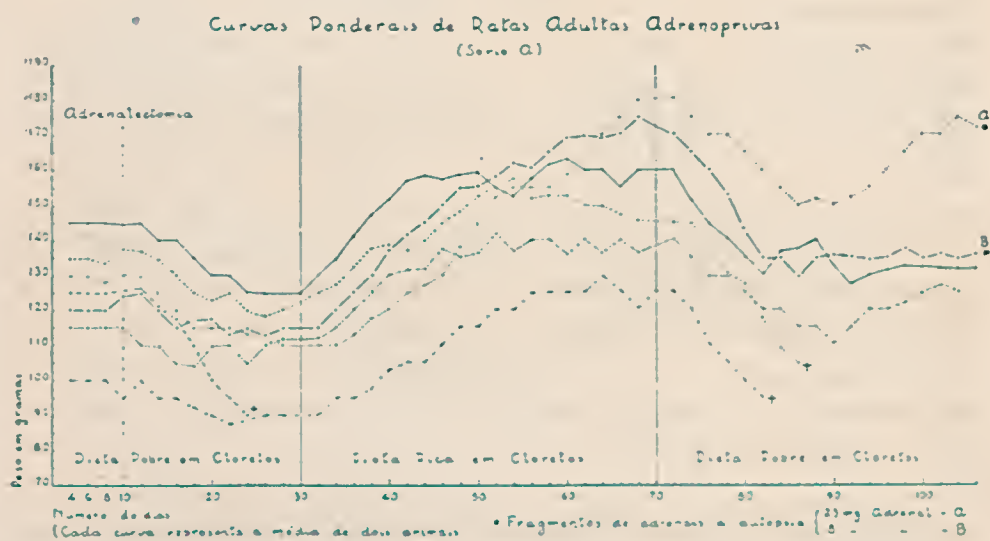



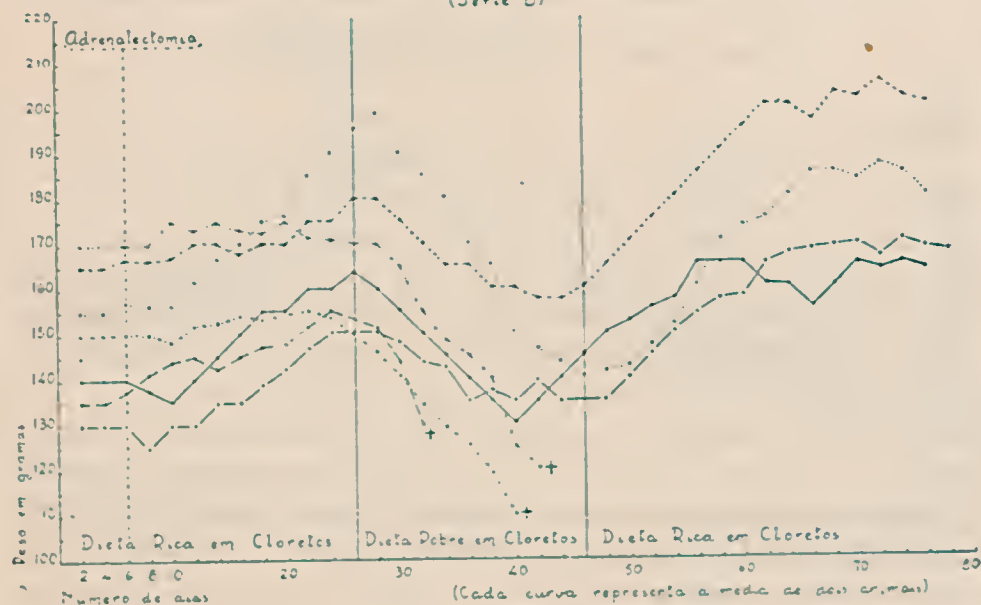
GRAFICO II

Ciclo Estral de Ratas Adrenoprivas em Relação à Alimentação
Serie 3

Adrenolectomia

| Ratas Nos | Normais | Dieta Rica em Cloretos | Dieta Pobre em Cloretos | Dieta Rica em Cloretos |
|---|---|---|---|---|
| 1 | • • | • • • | • | • • • |
| 2 | • • | | + | |
| 3 | • • | • • • | | • • |
| 4 | • • | • • | + | |
| 5 | • • | • • • | • | • • • |
| 6 | • • | • • | | • • • |
| 7 | • • | • • | | • • |
| 8 | • • | | + | |
| 9 | • • | • • • | | • • • |
| 10 | • • | • • | + | |

Dias 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

## GRAFICO III

## GRAFICO IV

Ciclo Estral de Ratas Adrenoprivas em Relação à Alimentação
Serie 2

Adrenalectomia

Ratas nºs — Normais — Dieta Rica em Cloretos — Dieta Pobre em Cloretos — Autopsia

Ratas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Autopsia: 1 — 15 mg; 4 — 8 mg; 5 — 4 mg; 6 — 22 mg

Dias: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65

| Ratas | Nº de Ratas | Nº medio de dias em observ. | Nº Estros (media) |
|---|---|---|---|
| Normais (Antes da Operação) | 23 | 10 | 2 |
| Operadas (Dieta Rica em Cl) | 23 | 25 | 2,6 |
| .. ( .. Pobre .. ) | 23 | 23 | 1,5 |
| .. ( .. Rica - Pobre em Cl) | 23 | 48 | 41 |

RESULTADOS

Os gráficos 1, 2, 3, e 4 nos mostram que as ratas normais apresentam pêso pouco variável e estro de 4 a 6 dias. Uma vez em adrenalectomia bilateral e deixadas em dieta pobre em cloretos (Gráfico 1-3) elas perdiam o pêso paulatinamente e permaneciam em diestro (a maioria delas) ou com estros espaçados. Das 48 ratas faleceram 8 nos 8 primeiros dias.

Quando operadas e deixadas em dieta de refôrço (Gráfico 3 e 4), os estros espaçavam-se, porém não perdiam o pêso corporal. Uma vez em dieta de adrenoprivos a maioria definhava. As ratas que não perdiam ou perdiam pouco pêso corporal e com estros periódicos pouco espaçados, apresentavam fragmentos de adrenais acessorias (Gráfico 1 e 4).

Com o retôrno do regime rico em cloretos, as funções se recuperavam em parte; os estros tornavam-se cíclicos e os animais aumentavam de pêso.

A diminuição ou supressão dos estros parece dar-se por intermédio da hipófise, porque segundo Martin (6), no regime acloretado, há diminuição da produção do hormônio gonadotrópico verificado pelo transplante hipofisário (a hipófise implantada não produz ovulação nem estro e suas células apresentam-se degeneradas: diminuição das granulações, do aparelho de Golgi e revertem-se para cromófobas).

Os adrenalectomizados unilateralmente não modificavam o ciclo estral tanto na dieta rica como na dieta pobre em cloretos, sendo que nesta perdiam pêso discretamente.

Del Castillo (7) observou que a estrona produzia estro permanente em ratas castradas; porém, depois de certo tempo, as células vaginais cansavam de responder a estrona, tornavam-se nucleadas e acompanhadas de leucócitos. Para sabermos se a alimentação cloretada tinha influência na resposta vaginal aos estrogênios, utilizamos 10 ratas castradas e injetadas com 10 U. I. diárias de Benzoato de Estradiol. Após 20 dias começamos a observar um cansaço na resposta á estrona pelo aparecimento de células nucleadas e leucócitos. A alimentação rica ou pobre em cloretos não influenciou no resultado.

Di Paola (8) (9) observou que a adrenalectomia sensibilizava a resposta á estrona. Em ratas adrenoprivas, a estrona em pequenas dóses produzia estros permanentes. Nós utilizamos 10 dessas ratas castradas e injetadas com Benzoato de Estradiol que apresentavam cansaço vaginal e fizemos a adrenalectomia; o resultado foi o aparecimento da queratinização. Isso nos leva a crer,

mais uma vez, no antagonismo entre os estrogênios e os hormônios androgênicos da cortex da adrenal.

Essas mesmas ratas deixamo-las em seguida, primeiro em dieta rica e depois em dieta pobre em cloretos. Todas elas continuaram a permanecer em estro. Isso mostrou que a alimentação cloretada não influiu na resposta vaginal aos estrogênios, e, portanto, a desoxicorticoesterona não parece ser causadora do cansaço vaginal e sim outro corticóide.

## CONCLUSÕES

1.°) A adrenalectomia unilateral não altera a função ovariana.

2.°) A adrenalectomia total em regime rico em cloretos faz espaçar o número de estros.

3.°) A adrenalectomia total, em regime pobre em cloretos, suspende a função ovariana ou escasseia o número de astros além de diminuir sensivelmente o pêso corporal dos animais; as funções se recuperam em parte com o retôrno do regime rico em cloretos.

4.) Em alguns casos de adrenoprivo o número de estros e o pêso corporal pouco variaram devido a restos de adrenais ou a adrenais acessorias.

5.°) As células vaginais cansam de responder queratinizadamente as dóses continuadas de Benzoato de Estradiol, porém a adrenalectomia faz retornar a queratinização contínua.

6.°) A alimentação cloretada não influiu na resposta vaginal ao Benzoato de Estradiol.

## RESUMO

O autor estuda, em ratas adultas, as relações entre os ovários e as adremais por intermédio da adrenalectomia, da ooforectomia e pela administração do Benzoato de Estradiol. Conclui que a adrenalectomia unilateral não altera a função ovariana, ao passo que a bilateral, em regime pobre em cloretos, sūspende ou escasseia o número de estros e em regime rico, faz espaça-los. A adrenalectomia faz retornar a queratinização contínua em ratas castradas e injetadas com Benzoato de Estradiol. Neste caso a alimentação rica ou pobre em cloretos não exerceu qualquer influência.

ABSTRACT

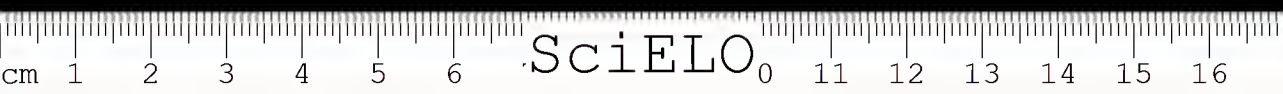
The relation between ovaries and adrenals was studied, in adults rats, by adrenalectomy, ooforectomy and estradiol benzoate administration.

The unilateral adrenalectomy does not bring alterations to the ovarian functions; but bilateral adrenalectomy, in rats in adrenoprive diet, brings a stop or a decrease in the mumber of oestrus and in a rich chloride diet delays its frequency.

The return of the continue keratinization was observed by the adrenalectomy of the ooforectomized rats injected with estradiol; in this case the diet did not show influence.

*Agradecimentos* — Os nossos agradecimentos ao Prof. Dr. J. Ribeiro do Valle pelo estímulo e orientação na execução deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. *Lyman, A.* — *Am. J. of Physiology*, **85**:414, 1928.
2. *Del Castillo, E. B.* — Le cyclo vaginal du rat normal et descapsulé, *Com. Rend. Soc. Biol.*, **99**:1403, 1928.
3. *Clark, W. C.* — Maintenance of adrenalectomized guinea pigs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**:253, 1941.
4. *Koneff, A.; Holmes, R. & Desse, J.* — Prevention of adrenalectomy changes in anterior pituitary of rat by sodium chloride administration, *Anat. Rec.*, **79**:275, 1941.
5. *Ingle, D.; Gunther, G. & Nezamis, J.* — Effect of diet in on rats on adrenal weights and on survival following adrenalectomy, *Endocrinology*, **32**:410, 1943.
6. *Martin, S. J. & Fazekus, J. F.* — Effect of sodium therapy on the ciclus and hipophysis of bilaterally suprarrenalectomized rats, *Proc. Soc. Biol. Med.*, **37**:369, 1941.
7. *Del Castillo, E. B. & Calatroni, C.* — Cycle sexuel periodique et folliculine, *Com. Rend. Soc. Biol.*, **104**:1024, 1930.
8. *Di Paola, G.* — Respuesta vaginal a la estrona continua y suprarrenalectomia, *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **15**:61, 1939.
9. *Del Castillo, E. B. & Di Paola, G.* — Respuesta vaginal al estradiol y desoxicorticoesterona, *Rev. Soc. Biol.*, **15**:434, 1939.

# ESTUDOS SÔBRE A VACINAÇÃO ANTITIFICA

## 1. *Vacinação pelo método de Felix*

POR JANDYRA P. DO AMARAL & PAULO M. G. DE LACERDA JR.

*(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)*

A clássica vacina antitifica, um dos mais antigos processos de imunização, tem sido profundamente modificada pelos trabalhos de Felix (1) que chamando a atenção para o pequeno interesse imunológico dos anticorpos flagelares, verifica o valor dos antígenos O, e muito essencialmente do antígeno Vi, nas provas de proteção contra a infecção tifica experimental. Como o antígeno Vi só é encontrado em culturas virulentas e é termolabil, Felix institui uma técnica de preparo de vacina com amostras virulentas de B. tíficos mortos e preservadas pelo alcool, de maneira a reter intacto o antigeno Vi.

Em seus trabalhos êle prova ainda, (2) que empregando este tipo vacina consegue-se produzir u'a imunidade satisfatória e com o mínimo da reação, usando-se apenas duas dóses de 0.25 e 0.5 ml, portanto, com um número muito menor de germens do que com a clássica vacina morta pelo calor e preservada pelo fenol, da qual eram necessarias 3 dóses de 0.5-1, e 1, ml.

Sabemos que o poder protetor da vacina tifica pode ser avaliado por três métodos: —

1) pela imunização ativa de camundongos;

2) pela imunização de coelhos e provas posteriores para a verificação do aparecimento dos anticorpos 0 e Vi;

3) pela dosagem dos anticorpos 0 e Vi no sôro de individuos vacinados.

O 1.º método citado, imunização ativa de camundongos, é o menos sensivel, servindo unicamente, se negativo, como prova de seleção impugnando uma vacina.

Por qualquer um dos outros métodos, porém, é possível avaliar mais ou menos seguramente o poder protetor duma vacina tifica.

Recebido para publicação em 17-7-47.

— No presente trabalho foram estudadas as possibilidades, em nosso meio, do emprego da vacina Vi de Felix, sendo referidos os resultados das dosagens realizadas em 213 indivíduos vacinados.

A vacina por nós usada, (*) segundo a técnica original de Felix, teve como prova preliminar de seleção a dosagem em camundongos, que, sendo inoculados com 500 milhões de germens, mostraram proteção contra 500 a 1000 D. M. L. de bacilos tíficos.

Estas provas obedeceram à técnica aconselhada por Longfellow & Luippold (3).

## MATERIAL E MÉTODOS

*Preparação da vacina:* — A amostra usada Ty2, bastante enriquecida em antígeno Vi por várias passagens em camundongos, foi cultivada em garrafas de Roux com agar simples, sendo o crescimento de 24 horas a 37.° lavado com 20 ml de solução fisiológica. A cada 20 ml da suspensão de germens adicionaram-se 60 ml de alcool absoluto. Tal suspensão bacteriana, que continha, pois, 75% de alcool foi conservada em frascos bem arrolhados e ao abrigo da luz durante 2 a 3 dias, agitando-se diversas vezes durante este período. A seguir, foi feita a decantação do alcool sobrenadante e o volume primitivo foi recomposto com novo alcool a 75%, preparado com 60 horas de antecedência. Nesta 2.ª fase a suspensão foi conservada na geladeira. Finalmente foi feita a diluição da solução mãe dos germens com solução fisiológica adicionada de 22% de alcool para 1000 milhões de germens por ml.

*Verificação da imunidade e eficiência da vacina:* — Foram vacinados por via subcutânea 211 indivíduos com 2 dóses da referida vacina, sendo a 1.ª de 0,25 ml e a 2.ª de 0,5 ml; o intervalo entre as 2 injeções foi de 8 dias, sendo que estas dóses foram administradas indistintamente para homens e mulheres.

No intervalo entre as dóses vacinantes e ainda até 10 dias após a última dóse, verificou-se apenas em poucos casos ligeira reação local e raramente uma reação geral forte. Em uma média de 2% se apresentou ligeira reação térmica, dores locais e nauseas. Foi encontrado com frequência no local da inoculação da vacina ligeiro nódulo que, porém, se reabsorveu sem maiores consequências.

(*) Vacina preparada por um de nós (P. L.).

Destes 211 pacientes, 88 eram operarios e estudantes e 123 doentes mentais do Hospital do Juquery, S. Paulo. No primeiro grupo, isto é, nos indivíduos não hospitalizados, não foi feita sangria preliminar para a verificação das aglutininas já existentes no sôro; cremos porém que esta prova poude ser compensada de maneira satisfatoria pelos dados seguros fornecidos pelos pacientes de não terem jamais contraído febre tifóide. Nos restantes 123 indivíduos hospitalizados foi feita uma sangria preliminar que, pondo em evidência os anticorpos já existentes, supriu a falta de dados anamésicos seguros para estes doentes mentais. Em 113 pacientes deste 2.º grupo foi feita uma sangria 10 dias após a última dóse de vacina, sendo o sôro separado e guardado em geladeira para se procederem ás dosagens, sempre depois de 48 horas.

A dosagem do antígeno 0 foi executada com amostra "0 901". A incubação foi feita em banho maria a 45.º, sendo a leitura realizada 20 a 24 horas após. Para a pesquisa do antígeno Vi foi usada a amostra Bhatnagar; a leitura foi feita após incubação em banho maria a 37.º, seguida de permanência dos tubos por 20-24 horas em temperatura ambiente.

A leitura dos titulos aglutinantes foi baseada na maior diluição que apresentou aglutinação visivel a olho nú.

## RESULTADOS

Nossas verificações sôbre os anticorpos 0 e Vi foram realizadas, assim para 2 grupos distintos: — um primeiro grupo para o qual não foi feita sangria preliminar e um segundo lote com sangria inicial e final.

Julgamos, porém, que poderiamos instituir para o 1.º grupo como ponto de comparação o índice médico geral de aglutininas 0 e Vi existentes nos indivíduos normais.

Nossas observações indicam que em 80% dos casos se encontra um titulo aglutinante inferior a 1/20 e que apenas em 4 casos (cerca de 5%), observou-se titulo superior a 1/80. Quanto as aglutininas Vi, jamais foram encontradas em titulo igual, ou superior a 1/20. A tabela I indica com detalhe os titulos iniciais encontrados.

Nossos resultados estão mais ou menos em relação com os de Macedo Leme e Carrijo (4) que indicaram uma porcentagem de 18,69 de individuos com titulos de 0 a 1/20 e de 3,34 para titulos iguais ou superiores a 1/80. Se compararmos estes titulos aos apresentados pelos pacientes do 1.º grupo 10 dias

após a vacinação, chegaremos á conclusão que, apesar de indiretamente, a comparação se torna simples pois os dados são claros e absolutamente concludentes.

TABELA I

*Titulos de aglutininas 0 e Vi em indivíduos não vacinados.*

| aglutininas | $<\frac{1}{20}$ | $\frac{1}{20}$ | $\frac{1}{40}$ | $\frac{1}{80}$ | $\frac{1}{160}$ | $\frac{1}{320}$ | $\frac{1}{640}$ | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| O | 99 | 9 | 10 | 4 | — | — | 1 | 123 |
| Vi | 123 | — | — | — | — | — | — | 123 |

Não se pode negar o poder protetor da vacina pois os titulos finais são notavelmente superiores. É o que se pode apreciar na tabela II.

TABELA II

*Titulos de aglutininas 0 e Vi nos indivíduos vacinados e que não sofreram sangria inicial.*

| aglutininas | $<\frac{1}{20}$ | $\frac{1}{20}$ | $\frac{1}{40}$ | $\frac{1}{80}$ | $\frac{1}{160}$ | $\frac{1}{320}$ | $\frac{1}{640}$ | $\frac{1}{1280}$ | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| O | 6 | 13 | 20 | 23 | 17 | 8 | 1 | — | 88 |
| Vi | 4 | 1 | 10 | 20 | 25 | 16 | 8 | 4 | 88 |

O anticorpo Vi que se apresentou em 100% dos pacientes com titulo abaixo de 1/20 se mostra extraordinariamente aumentado, pois sómente em (4.5% dos mesmos se comporta como na tabela I; o indice maior de aglutininas aparece acima de 1/80 e abaixo de 1/320) O mesmo se observa para as seguintes aglutininas 0, onde a porcentagem de 80.4 para titulos abaixo de 1/20 é reduzida a 7.

Para o segundo grupo de pacientes, cujas comparações foram realizadas diretamente pelas sangrias inicial e final, a mesma sequência se verifica, havendo uma grande diminuição dos titulos negativos, com consequente aumento dos titulos mais altos, para o anticorpo 0, e sempre com maior intensidade para as aglutininas Vi. É o que se pode verificar com detalhe na tabela III.

TABELA III

*Titulo de aglutininas 0 e Vi nos indivíduos vacinados e que sofreram sangria inicial*

| aglutininas | < 1/20 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| O | 6 | 13 | 28 | 30 | 22 | 11 | 3 | — | 113 |
| Vi | 9 | 3 | 18 | 38 | 25 | 14 | 3 | 3 | 113 |

A tabela IV nos dá uma ideia da imunidade conferida pela vacina duma maneira mais nítida, isto é, pela relação entre o número de soros e o aumento de titulos entre a 1.ª e a 2.ª sangria.

TABELA IV

*Relação do aumento do titulo para aglutininas 0 e Vi entre a 1.ª e a 2.ª sangria*

| Aglutininas | Sem alteração | | 2X | 4X | 8X | 10X ou + | Total | porc. de titulos não alterados | porc. de titulos pelo menos duplos aos iniciais |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | < 1/20 | 1/20 | | | | | | | |
| O | 6 | 2 | 18 | 33 | 26 | 28 | 113 | 7,0 | 92,9 |
| Vi | 9 | — | 3 | 18 | 37 | 4[illegible] | 113 | 7,9 | 92,1 |

Nossa tabela é altamente encorajadora pois Felix em seus trabalhos (2) já computa como titulos Vi significantes depois da vacinação, aqueles que se mostraram duplamente aumentados, acrescimos portanto bem inferiores aos encontrados por nós.

De nossas observações resulta portanto a conclusão que com uma vacina Vi perfeitamente preparada já com duas dóses pode-se obter um indice porcentual imunitario bastante satisfatorio contra a febre tifóide.

O temor que parece existir para alguns, sôbre as fortes reações gerais ou locais em virtude da maior concentração de germens por ml. parece infundado, pois não verificamos nada mais do que sempre se esperou sôbre reações vacinais: — uma certa porcentagem reduzida de indivíduos com constituição mais

sensivel, apresentando reações locais ou gerais sem grande importância e que sempre desapareceram em 24-48 horas.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Foi estudado o poder protetor da vacina tífica preparada pela técnica de Felix.

Pela vacinação de 213 pacientes foi verificada a inocuidade da vacina que só produziu reações locais e gerais fortes em pequena porcentagem.

No local da inoculação quase sempre se formou um pequeno nódulo que porém se reabsorveu sem maiores consequências.

Foi verificado que duas injeções de 0.25 e 0,5 ml. respectivamente são suficientes para estimular a formação dos anticorpos 0 e Vi de maneira altamente satisfatoria.

## ABSTRACT

The protective power of a typhoid vaccine, prepared according to Felix's technique, has been studied on a total of 213 patients. Apart from local reactions and violent general reactions, in a small percentage of inoculated persons, the vaccine caused no serious harmful reactions.

In almost every case, a small nodule formed at the site of inoculation, which however disappeared completely after a few days.

It could be shown that two vaccine injections of 0.25 and 0.5 ml respectively are sufficient to stimulate the formation of 0 e Vi antibodies to a satisfactory height.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Felix, A.* — A new type of the typhoid and paratyphoid vaccine, *British Med. J.*, **1**:391-395, 1941.
2. *Felix, A.; Rainsford, S. G. and Stokes, E. J.* — Antibody response and systemic reactions after inoculation of the new type of T. A. B. C. vaccine *British Med. J.*, **1**:435, 1941.
3. *Longfellow, D. & Luippold, G. F.* — Typhoid vaccine studies. Vi. The production of of cross — imunity between members of typhoid-paratyphoid group of microorganisms, *Journal of Immunology*, **45**:249-260, 1942.
4. *Leme, J. S. Macedo & Carrijo, L. N.* — Nivel médio de aglutininas tíficas em S. Paulo, *Mem. Inst. Butantan*, **17**:121, 1943.

# ESTUDO COMPARATIVO DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS DO GÊNERO *PAMPHOBETEUS* POCOCK, 1901 (*MYGALOMORPHAE*)

POR W. BÜCHERL

*(Do Laboratório de Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

Entre as *Theraphosinae* do Brasil chama mais atenção o gênero *Pamphobeteus* Pocock, 1901, em primeiro lugar porque pertence a este gênero a grande maioria das caranguejeiras, principalmente do Estado de São Paulo e depois porque os caracteres morfológicos que, separadamente ou em conjunto, foram aproveitados pelos especialistas na sistematização específica dos exemplares deste gênero são sujeitos a variações tão amplas, que se torna praticamente dificílimo senão impossível, classificar com exatidão a espécie a que pertence determinado indivíduo deste gênero.

Existem, nos trabalhos realizados por especialistas nacionais e estrangeiros, algumas falhas basicas comuns que devem ser apontadas como responsáveis pela confusão sistemática dentro deste gênero: —

1) a escassez de exemplares e a consequente ausência de dados comparativos sobre o valor específico deste ou daquele caracter morfológico;

2) o fato de terem sido descritas espécies novas quase sempre apenas com fêmeas, ignorando os próprios autores os respectivos machos.

Assim Ausserer (1), em 1871, descreve como espécie nova a *Pamphobeteus isabellinus*, com habitat no Estado do Rio de Janeiro, baseando sua descrição apenas num único exemplar, uma fêmea.

Em 1880 foi descrita a segunda espécie brasileira, a *Pamphobeteus benedenii* (*Lasiodora benedenii*), por Bertkau (2), baseada igualmente apenas numa fêmea.

Em 1923, C. de Mello-Leitão (3), estabeleceu nada menos de 12 espécies novas, descrevendo igualmente apenas uma fêmea para cada espécie, sem referir-se a machos. São as seguintes as espécies novas do referido autor:

---

Recebido para publicação em 30-7-47

*Pamphobeteus platyomma* ................ fêmea.
*Pamphobeteus rondoniensis* ............ fêmea.
*Pamphobeteus roseus* .................... fêmea.
*Pamphobeteus sorocabae* ................ fêmea.
*Pamphobeteus melanocephalus* ........... fêmea.
*Pamphobeteus cesteri* .................... fêmea.
*Pamphobeteus cucullatus* ................ fêmea.
*Pamphobeteus tetracanthus* ............ fêmea.
*Pamphobeteus* holophaeus ............... fêmea.
*Pamphobeteus exsul* ..................... fêmea.
*Pamphobeteus insularis* ................ fêmea.
*Pamphobeteus anomalus* ................. sem indicação do sexo.

Finalmente, a fauna brasileira deste gênero foi enriquecida ainda com novas espécies por S. de Toledo Piza Jr. e por B.M. Soares.

O primeiro (4) descreveu como espécie nova a *Pamphobeteus piracicabensis,* baseando-se em 9 exemplares, todos fêmeas. O autor, infelizmente, não se libertou das normas costumeiras na apreciação dos caracteres morfológicos, mas como que antevendo sàbiamente o pouco valor sistemático, principalmente do tamanho, da distância e da posição dos olhos e do número e posição dos espinhos das pernas, ele termina a descrição da espécie acima, dizendo:

"Todos esses caracteres, usados também na diagnóse das outras espécies, são aqui, conforme pude constatar pelo exame de 9 exemplares, sujeitos a variação, de maneira que é possivel que o número de espécies de Terafosoidéas desse e de outros gêneros venha a reduzir-se, quando se conhecer melhor a amplitude dessas variações."

Mais tarde, o mesmo autor (5) descreve como novos a *Panphobeteus masculus* 1 macho só e a *Pamphobeteus communis* 14 machos.

Também estas descrições foram terminadas pelo autor com as seguintes palavras: "Do exame que procedi nos 13 paratipos desta espécie, muito frequente em Piracicaba, pude, mais uma vez, constatar as variações, a que estão sujeitos os caracteres, levados em conta na definição das espécies o que muito compromete a segurança do conceito de espécie relativamente à aranhas. Assim, os olhos anteriores podem ser equidistantes, como podem os médios ser muito pouco mais afastados entre si que dos laterais. O tamanho também varia, podendo-se mostrar quase iguais. Os olhos laterais anteriores e posteriores podem distar apenas um quarto de diâmetro. A fóvea torácica pode ser direita ou procurva e as sigilas esternais curtas e largas. As tibias I podem ser muito espinhosas e a apófise apical esterna provida de um forte dente esterno. A apófise interna pode ser destituida de dente. A tibia dos palpos pode ser armada de 2-2-2-1-1 espinhos internos".

Em 1944 S. de Toledo Piza Jr. (6) descreveu ainda as seguintes espécies novas:

*Pamphobeteus mus* ........................ fêmea.
*Pamphobeteus cephalophoeus* .............. fêmea.

B.M. Soares (7) estabeleceu, seguindo da mesma forma os critérios apontados pelo prof. C. Mello-Leitão, as seguintes espécies novas:

*Pamphobeteus urbanicolus* ................ fêmea.
*Pamphobeteus ypirangensis* ............... 3 machos.

O bem avisado e prudente autor conclui, à pagina 267: "O critério adotado deverá ser este, até quando se puder, com segurança, obter as variações possíveis dentro destas espécies, pelo exame de grande número de exemplares. Julgo que, diante dos estudos feitos pelo prof. Toledo Piza nos 13 exemplares de *P. communis* Piza e em *P. piracicabensis* Piza, todas as espécies brasileiras deste gênero virão algum dia a ser reunidas em, apenas, duas ou três".

C. Mello-Leitão tem o mérito indiscutivel de ter lançado as bases sistemácas para a especificação das migalomorfas brasileiras. Entretanto, justamente no tocante ao gênero *Pamphobeteus,* o autor certamente dispôz de material deficiente quantitativamente, a impossibilitar um estudo comparativo, mais aprofundado, das variações.

Na caracterização génerica, por exemplo, o autor diz que, nos machos os metatarsos se dobram "sôbre o ápice" da apófise ínfero-esterna e, algumas paginas depois, lê-se ... "os metatarsos se flexionam entre as duas ápofises apicais".

Ainda na descrição genérica de *Pamphobeteus* lemos: "Olhos anteriores pouco desiguais, equidistantes, em linha bem procurva.... Laterais posteriores menores que os anteriores ... Metatarsos dos dois primeiros pares de pernas com escópulas que vão ter à base do segmento; os do terceiro par com escópulas em cerca de dois terços apicais; os posteriores com pequenas escópulas apicais". "Na caracterização específica, porém, e já na chave sinótica das então 13 espécies brasileiras o mesmo autor se afasta sensivelmente do que êle mesmo diz, ser genérico, atribuindo aos olhos, às escópulas metatarsais, às dimensões das pernas, etc... importância específica.

O próprio autor, porém, ainda que tenha apenas tido fêmeas para a sua chave sinótica, chama-lhes de "muito affins".

Vejamos, agora, os caracteres morfológicos que foram tomados pelos referidos autores como essenciais para a criação de espécies novas.

Consideremos, em primeiro lugar, a extensão da área ocupada pelas escópulas metatarsais dos quatro pares de pernas. Tendo realizado medições das escópulas dos metatarsos em 142 exemplares, distribuidos para 5 espécies de *Pamphobeteus,* chegamos ao seguinte resultado invariável:

a) Metatarsos do primeiro par de pernas escopulados quase até a base;

b) Metatarsos do segundo par de pernas escopulados igualmente até a base ou, muito raras vezes, um pouco menos;

c) Metatarsos do terceiro par de pernas escopulados nos dois terços apicais (raras vezes apenas na metade apical);

d) Metatarsos do quarto par de pernas apenas com pequenas escópulas na ponta do ápice.

Em vista destes resultados conferimos as espécies novas dos citados três autores, reunindo as conclusões na seguinte tabela:

| Espécie de *Pamphobeteus* | Áreas ocupadas pelas escópulas dos metatarsos das pernas | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1.° par de pernas | 2.° par de pernas | 3.° par de pernas | 4.° par de pernas |
| *platyomma* . | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *benedenii* .... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *rondoniensis* . | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *roseus* ...... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *sorocobae* .... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *melanocephalus* | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *isabellinus* ... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *cesteri* ...... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *cucullatus* ... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *tetracanthus* . | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| holophaeus ... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *exsul* ........ | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *insuloris* ..... | não consta | | | |
| *piracicobensis* . | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *musculus* .... | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *communis* .... | não consta | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *urbanicolus* .. | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |
| *ypirongensis* . | não consta | | | |
| *onomolus* ... | até a base | 2/3 apicais | metade | apicais |
| *mus* ........ | até a base | | | |
| *cephalophoeus* . | até a base | até a base | 2/3 apicais | apicais |

Ressalta, pois, do esquema que estes dados se repetem em todas as espécies do gênero *Pamphobeteus*, não convindo, assim, às escópulas metatarsais nenhum valor específico, mas, no máximo, apenas importância genérica.

Vejamos, em segundo lugar, a conformação morfológica do cômoro ocular e dos olhos.

Já S. de Toledo Piza e B. M. Soares dão a estes característicos um valor específico muito relativo, senão nulo, como já assinalamos, referindo-nos aos estudos destes dois colegas. Seja declarado aqui, desde logo, que os termos: "Olhos anteriores em fila procurva, muito procurva, pouco procurva ou ainda muito pouco procurva, de maneira que uma linha tangente à borda anterior dos médios passa pouco adiante do meio dos laterais ou no meio dos laterais ou ainda um nada atrás do meio dos laterais", são absolutamente insuficientes e provavelmente até sem valor genérico. De fato, como temos auferido de medições e comparações do número de exemplares referido, estes dados variam não sómente de espécie em espécie, mas de indivíduo para indivíduo, segundo o método de apreciação do especialista. Variam atê mesmo num indivíduo, em que, muitas vezes, os olhos de um lado são de tamanho muito diferente dos do outro lado do cômoro ocular.

Para certificar-se melhor destes fatos, basta coordenar os seguintes dados:

O cômoro ocular dos *Pamphobeteus*, mais ou menos adultos, tem o comprimento médio mínimo de 1,4 mm por um comprimento médio máximo de 2,4 mm e uma largura média mínima de 2,0 mm e largura média máxima de 2,9 mm.

Para estes comprimentos e estas larguras, que, portanto, variam muitíssimo, temos a considerar ainda a existência de três planos diferentes de alturas do cômoro ocular, a saber:

a altura da posição dos olhos laterais;

a altura da posição dos olhos médios anteriores;

a altura do ponto mais elevado do cômoro ocular, atrás dos olhos médios anteriores.

Estas três alturas são: para os olhos laterais de 0,2 mínimo até 0,35 máximo; para os olhos médios anteriores de 0,4 mínimo até 0,6 mm máximo; para a maior elevação do cômoro ocular de 0,7 mínimo a 1,1 mm máximo.

Portanto, nos diversos níveis de elevação há novamente uma enorme variação. Isto significa que, si o especialista, ao considerar a posição dos olhos

(da fila dos olhos anteriores) por meio de uma lupa, conservando a aranha em posição estritamente horizontal sobre a platina, obterá, ao medir a linha dos olhos, um valor completamente diferente do que, quando a aranha é ligeiramente levantada anterior ou posteriormente. Estes valores já se apresentariam diferentes, mesmo quando os olhos de cada espécie fossem rigidamente iguais entre si; mas como os olhos variam também em tamanho, esses valores resultam tão diversos que são simplesmente, como dissemos acima, "insuficientes especifica e genericamente".

Quanto ao cômoro ocular de *Pamphobeteus* há a salientar que representa uma elevação subcircular, em cujo meio há uma nova alevação, que atinge o máximo de altura atrás dos olhos médios anteriores e posteriores, com o campo visual a abranger os lados da aranha.

Os olhos médios posteriores repousam em plano horizontal (mais ou menos) da primeira elevação, tendo seu campo visual para cima e para trás.

Os olhos médios anteriores, finalmente, se encontram nas bordas da segunda elevação, com campo visual para a frente, para cima e para os lados anteriores.

Os olhos médios anteriores são sempre redondos e apresentam um tamanho minimo de 0,4 e máximo de 0,6 mm. Os olhos laterais anteriores são ora ovais, ora quase redondos, geralmente, porém, redondos na frente e angulosos atrás e apresentam um diâmetro longitudinal médio mínimo de 0,5 e máximo de 0,8 mm e um diâmetro horizontal médio mínimo de 0,3 e máximo de 0,6 mm. Os olhos laterais posteriores apresentam, na maioria dos casos, a mesma forma dos laterais anteriores e os mesmos diâmetros, podendo, porém, ser ainda um pouco menores que os laterais anteriores. São geralmente redondos atrás e angulosos na frente. Seu diâmetro médio mínimo, na direção longitudinal, é de 0,3 mm e o médio máximo de 0,8 mm, com 0,3 a 0,6 de diâmetros horizontais mínimos e máximos respectivamente.

Os olhos médios posteriores apresentam, muitas vezes, forma irregular, podendo, no mesmo animal, variar em tamanho e forma (num lado pode haver completa fusão entre o ôlho médio posterior e lateral posterior e no outro lado não), até ovais, elipsoides, angulosos atrás, meio quadrados com cantos redondos ou ainda de contornos absolutamente irregulares, mas sempre com diâmetro longitudinal maior do que o horizontal (0,2 a 0,7 mm diâmetro longitudinal mínimo e máximo; 0,1 a 0,4 diâmetro em sentido atravessado).

Das medidas acima sôbre o cômoro ocular e os olhos se infere:

1) que a curvatura da fila dos olhos anteriores não pode constituir caracter específico seguro, pelo menos não no gênero *Pamphobeteus*;

2) que o tamanho, a distância entre os olhos anteriores, médios e laterais e entre os laterais anteriores e posteriores e ainda o tamanho e a distância dos médios posteriores variam extremamente, não sómente dentro da mesma espécie, mas até no mesmo indivíduo, sendo estas variações tão amplas que, si se quizesse atribuir importância específica a estes caracteres, qualquer exemplar de *Pamphobeteus* poderia ser posto sob qualquer espécie do mesmo gênero.

Chegamos a estas conclusões depois de termos conferido os cômoros oculares e os olhos de:

55 exemplares de *P. sorocabae* ....... (35 fêmeas e 19 machos);
42 exemplares de *P. roseus* .......... (37 fêmeas e 5 machos);
38 exemplares de *P. tetracanthus* ..... (25 fêmeas e 13 machos);
21 exemplares de *P. cesteri* .......... (13 fêmeas e 8 machos);
7 exemplares de *P. rondoniensis* (?) ( 7 fêmeas ).

No mesmo exemplar os olhos da direita podem ser menores do que os da esquerda como pode o ôlho médio posterior estar unido, num lado, ao lateral e, no outro lado, separado.

Em exemplares diferentes, mas da mesma especie, os olhos laterais posteriores ora são iguais, ora menores ou maiores (o último caso é raro, mas existe igualmente) do que os laterais anteriores. Os olhos médios anteriores ora são maiores, ora são iguais, ora menores do que os laterais (devendo-se tomar em consideração que os médios são sempre redondos, muitas vezes, porém, circundados de um anel que facilmente é confundido com a quitina do cômoro ocular, — enquanto que os laterais nunca são completamente redondos, mas elipsoides ou angulosos no lado posterior de maneira que a apreciação objetiva da diversidade de tamanho entre estes olhos é estremamente difícil. Esta dificuldade é ainda aumentada pelo fato, já exposto, de estes olhos se encontrarem em niveis de altura e posição completamente diferentes).

Os olhos médios posteriores ora são duas e meia vezes menores do que os laterais posteriores ora são quase iguais em tamanho a estes.

O próprio cômoro ocular, na mesma espécie, varia em comprimento, largura e nas alturas podendo ora ser quase duas vezes mais largo do que longo, ora apenas um pouco mais largo do que longo. Nunca, porém, é completamente redondo.

Julgamos, pois, poder concluir com toda a segurança que a conformação morfológica do cômoro ocular e a disposição dos olhos não formam igualmente nenhum caracter morfológico específico no gênero *Pamphobeteus*.

Insistimos nestas comparações, porque nos trabalhos sistemáticos dos diferentes autores, principalmente na chave sinótica de Mello-Leitão se dá grande importância especifica aos olhos e ao cômoro ocular. Aliás o próprio Mello-Leitão, quando descreve as espécies separadamente, reduz novamente esta importância específica, como vamos ver:

a) *Cômoro ocular*:

"Muito baixo, duas vezes mais largo que longo" (Mello-Leitão, p. 228)... *P. platyomma*;

"... alto, duas vezes mais largo que longo..." (idem, p. 234) *P. melanocephalus* e *holophaeus*;

As três espécies, portanto, apresentam as mesmas medidas da rima ocular. Mas também vimos acima que *P. sorocabae, roseus*, etc.... apresentam indivíduos com as mesmas medidas. Ainda cumpre salientar, neste conjunto, que tivemos a oportunidade de reexaminar o tipo *P. platyomma* (No. 155 do Departamento de Zoologia, em São Paulo) e encontramos as seguintes medidas da rima ocular: 1,9 mm de comprimento por 2,4 mm de largura. Portanto, não é duas vezes mais larga do que longa.

Todas as outras espécies de *Pamphobeteus*, descritas pelos três autores citados, apresentam rima ocular um pouco mais larga do que longa (Ver Mello-Leitão, Toledo Piza e Soares, nas obras citadas).

b) *Olhos e disposição ocular*:

1) Uma reta tangente à borda anterior dos médios passa adiante do meio dos laterais: *P. platyomma; roseus; sorocabae; isabellinus; cesteri; tetracanthus; anomalus; piracicabensis; ypirangensis; urbanicolus* — (Mello-Leitão; Toledo Piza; Soares, *opera citada*).

2) Uma reta tangente à borda anterior dos médios passa atrás do meio dos laterais: *P. benedenii* e *holophaeus* — (Bertkau: Mello-Leitão, nos trabalhos citados).

3) Uma reta tangente à borda anterior dos médios passa no meio dos laterais: *P. rondoniensis; melanocephalus; cucullatus; exsul; insularis* — (Mello-Leitão).

Toledo Piza, nos dois trabalhos citados, ao descrever *P. masculus, communis, mus* e *cephalophoeus* já relega este caracter em segundo plano, omitindo simplesmente "a reta dos olhos anteriores".

c) *Tamanho dos olhos e distância interocular:*

Os três autores admitem as seguintes modalidades: médios anteriores menores que os laterais — *platyomma, sorocabae, melanocephalus, cesteri, holophaeus, exsul, insularis, cephalophaeus, mus, masculus, communis, urbanicolus, ypirangensis;* médios anteriores iguais aos laterais — *benedenii, rondoniensis, roseus, isabellinus, cucullatus, tetracanthus, anomalus;* laterais anteriores maiores que os posteriores — *platyomma, rondoniensis, cucullatus, tetracanthus, holophaeus, exsul, insularis, ypirangensis, urbanicolus, mus, cephalophaeus, communis, masculus;* laterais anteriores e posteriores iguais — *benedenii, roseus, sorocabae, melanocephalus, isabellinus, cesteri, anomalus.*

Deduz-se disso que não existe caracter especifico como os próprios três autores deixam inferir. C. Mello-Leitão implicita e Toledo Piza e Soares esplicitamente (confira os trabalhos dos dois últimos, nas paginas 121 e 7-8 e ainda 269 a 270).

A fóvea torácica transversal, direita, procurva ou recurva; o cumprimento e a largura do esterno; o espaço entre a margem do esterno e a sigila posterior, são outros caracteres que, ao conferirmos os 163 exemplares adultos da coleção do Instituto Butantan, variam de tal maneira que são praticamente inaproveitáveis para a especificação de *Pamphobeteus.*

Quanto ao número e à posição dos espinhos que armam os artículos das pernas e dos palpos, há novamente uma grande variação, até mesmo num só indivíduo, onde os espinhos de uma perna, dum lado, não correspondem nem em número, nem na posição exata, aos da outro perna, do outro lado.

Seria temerário, pois, pretender que o número dos espinhos constitua um caracter específico fixo.

Vejamos os três citados autores e sua apreciação das medidas do esterno das 19 espécies de *Pamphobeteus*: "Esterno um pouco mais longo do que largo"

— *P. platyomma, benedenii, rondoniensis, sorocabae, melanocephalus, urbanicolus, communis, masculus, mus, cephalopheus, piracicabensis.*

O próprio Mello-Leitão parece ter atribuido muito pouco valor a este caracter, pois, em grande número de espécies êle nem cita as medidas (*roseus, cesteri, cucullatus, tetracanthus, holophoeus, exsul, insularis*), como também Soares omite a descrição do esterno em *ypirangensis*.

Para a sistematização foram, em geral, aproveitados os espinhos:

a) das tíbias dos palpos;

b) das tíbias dos quatro pares de pernas;

c) dos metatarsos dos quatro pares de pernas.

Quanto à disposição *"in loco"* destes espinhos, principalmente nas tibias e nos metatarsos das pernas, costumam distinguir-se:

a) espinhos ínfero-apicais;

b) espinhos inferiores;

c) espinhos anteriores;

d) espinhos posteriores.

Na prática, porém, sòmente raras vezes, os espinhos obedecem a uma distribuição ordenada. Pelo contrário, em geral, não se podem distinguir rigidamente espinhos inferiores, anteriores e posteriores. O próprio Soares, com acerto, abandonou esta divisão, seguindo a orientação de Toledo Piza, distinguindo apenas entre espinhos apicais e laterais inferiores.

Quanto ao numero dos espinhos das tibias dos palpos e das tibias e dos metatarsos das quatro pernas, há uma certa regra, que pode ser resumida assim:

"O número de espinhos das tibias e, mais ainda, dos metatarsos de *Pamphobeteus* aumenta progressivamente nas pernas posteriores até tornarem-se francamente "numerosos" (acima de 20) nos últimos metatarsos. Sua distribuição, porém, é bastante irregular, de maneira que, só raras vezes, podem ser computados como pertencentes a uma fila anterior, uma fila posterior e uma fila inferior. Apenas os espinhos apicais apresentam disposição certa (ínfero-lateral dos ápices), si bem que também costumam aumentar em número nas pernas posteriores, ou, melhor, aos dois clássicos espinhos apicais são acrescidos lateralmente mais outros espinhos, geralmente menores e, às vezes, um tanto afastados da borda lateral; em alguns casos acumulados numa área apical".

Representando este fato em números, poder-se-ia estabelecer a seguinte média de espinhos, característica talvez não sòmente para o gênero *Pamphobeteus*, mas para todas as terafóseas:

Tíbia I — 2 espinhos apicais e 0-2 espinhos látero-inferiores;
Tíbia II — 2 espinhos apicais e 0-3 espinhos látero-inferiores;
Tíbia III — 2 espinhos apicais (e 1-1 apicais secundários) e 8 a 11 espinhos látero-inferiores;
Tíbia IV — 2 espinhos apicais (e 1-3 apicais secundários) e 8 a 14 espinhos látero-inferiores;
Metatarso I — 2 espinhos apicais;
Metatarso II — 2 espinhos apicais;
Metatarso III — 2 espinhos apicais (e 0-3 apicais secundários); muitos espinhos látero-inferiores;
Metatarso IV — 2 espinhos apicais (1-6 apicais secundários) e numerosos espinhos látero-inferiores, mais do que nas tíbias correspondentes.
Tíbias dos palpos: de 0 a 5 espinhos na face interna, sendo geralmente 3-4 apicais.

Convém, ainda, ter bem presente o fato de que são raríssimas as aranhas caranguejeiras adultas que não tenham perdido um ou outro espinho, principalmente, pelo hábito da caranguejeira defender-se contra pequenos mamíferos (camundongos, ratos, cuícas, gambás, etc...) esfregando, com as pernas trazeiras, em movimentos rápidos, o abdomen, fazendo desprender-se os finíssimos pêlos dorsais do mesmo que, levíssimos e munidos de ganchos na extremidade, envolvem o animal agressor e se encravam em suas mucosas, determinando viva irritação.

O desprendimento destes pêlos é principalmente causado pelos numerosos espinhos das tíbias e dos metatarsos das últimas pernas, sendo que, nesta operação, não poucos espinhos se desprendem igualmente pelo atrito. Verificamos este fato repetidas vezes e, ainda, esperamos ter a oportunidade de nos referir a êle, quando tratarmos dos hábitos de vida das caranguejeiras.

Ora, é extremamente difícil, na contagem dos espinhos, não omitir aqueles que faltam e cuja existência é apenas notada por pequeníssimas áreas, livres de pêlos, no ponto de sua inserção.

O comprimento total, geralmente medido pelos especialistas desde a extremidade do abdomen até a ponta da parte horizontal das quelíceras, é outro caracter muito relativo e sujeito a grandes variações mesmo já em animais vivos e, ainda mais, em animais conservados em altas concentrações alcoólicas.

Fêmeas, cheias de ovos, apresentam abdomen grande, repleto de ovos e de dimensões duas vezes maiores do que fêmeas não prenhes. Por outro lado podem as caranguejeiras ficar meses sem alimentar-se (desde que haja, porém,

água à sua disposição), notando-se o estado de fome principalmente pelo tamanho reduzido do abdomen. Tudo isto vem influir muito na medição do comprimento geral.

Resta, neste conjunto, esclarecer ainda a questão "adultos". Os autores, na aferição do comprimento total, consideram geralmente como animais adultos, todos os machos que têm orgão copulador na articulação terminal dos palpos e apófises tibiais no 1.° par de pernas e ainda um orgão estridulante (os dois últimos caracteres não existem em todos os gêneros) e todas as fêmeas com orgão estridulante (não em todos os gêneros) ou de porte avantajado. Este modo de pensar e agir é a consequência do fato de, mesmo os especialistas em sistemática de aranhas, aceitarem como realidade de que a caranguejeira, após sucessivas trocas de cutícula em diferentes períodos, cresce periodicamente até atingir a madureza sexual, caracterizada externamente pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários (apófises e orgão copulador e ainda, em alguns gêneros, aparelho estridulante, nos machos; aparelho estridulante, na maioria dos gêneros, nas fêmeas). Atingida esta última fase e iniciada a reprodução, não haveria mais muda de cutícula e, portanto, o animal não cresceria mais.

Em alguns trabalhos este conceito de "adulto" já foi posto em dúvida e pelas nossas observações em caranguejeiras, mantidas em cativeiro no Instituto Butantan, já há 4 anos, verificamos que, mesmo após procriação de filhotes, as fêmeas, quando bem alimentadas e quando colocadas em ambiente propício, continuam trocando a cutícula e aumentando de tamanho. Igualmente os machos, que, depois de terem feito a cópula com a fêmea, precisam ser separados dela, para não serem mortos e devorados, aceitam bem os alimentos e renovam a cutícula com novo crescimento.

Estes fatos foram observados não sómente no gênero *Pamphobeteus*, mas também em *Lasiodora*, *Acanthoscurria* e *Grammostola*.

Nos três últimos gêneros, em que existem igualmente os chamados "aparelhos estridulantes" como expressão de uma caracterização sexual secundária, constatamos que existe uma verdadeira graduação na formação destes orgãos estridulantes. Na fase imediatamente anterior à madureza sexual, depois da 4.ª muda de cutícula, já estão presentes os pêlos estridulantes, as apófises tibiais e o orgão copulador ainda que não completamente desenvolvidos.

Em *Acanthoscurria violacea*, por exemplo, os pêlos estridulantes nos trocantares dos palpos são apenas 3 a 5 em número, mal formados, duas vezes menores do que num exemplar muito crescido e nos trocanteres do primeiro par de pernas, ora não existe nenhum pêlo estridulante ora apenas são presentes 1 ou 2, ainda menores que os dos palpos.

Em animais muito crescidos, ao contrário, estes pêlos são grandes, em número acima de 10, baciliformes e com ramificações nítidas.

Estes fatos, condicionados às diversas fases evolutivas dos indivíduos, são de suma importância para a sistemática e demonstram claramente que não se pode tomar em consideração o comprimento de um determinado indivíduo como caracter específico.

Quanto à largura do cefalotorax dá-se o mesmo, como temos verificado em nossos exemplares. Acresce ainda o fato de que, no alcool, diminui a medida da largura do cefalotorax pela desidratação e consequente retração.

O comprimento das quatro pernas é apenas um caracter genérico ou nem mesmo isso, como já tem salientado implicitamente o próprio Mello-Leitão, não oferecendo medidas particulares em nenhuma espécie.

Em todos os indivíduos, por nós conferidos, tanto machos como fêmeas, o comprimento decresce na seguinte ordem:

4.° par;
1.° par;
2.° par;
3.° par.

Tendo, pois, demonstrado, à mão de mais de 700 exemplares de *Pamphobeteus*, entrados no Instituto Butantan durante os anos de 1944 a 1947, dos quais 168 exemplares foram exatamente medidos e comparados em todos os caracteres acima referidos, que ão podem ser aproveitados como caracteres específicos:

1) a extensão das escópulas dos metatarsos;
2) o comprimento, a largura e a altura do cômoro ocular;
3) o tamanho, a posição e a distância dos olhos;
4) o afastamento das últimas sigilas da margem do esterno;
5) o número dos espinhos nas articulações das pernas e dos palpos;
6) o comprimento total e a largura do cefalotorax;
7) a curvatura da fóvea torácica, o comprimento e a largura do esterno,

só nos restava procurar novos caracteres. Escolhemos, para isto, um caminho que só poderia ser trilhado por quem dispuzesse de grandes séries de exemplares do mesmo gênero.

Dentre os 700 exemplares de *Pamphobeteus* escolhemos os melhores, em número de 163 inicialmente (número este hoje já acima de 200 pelas chegadas continuas de caranguejeiras ao Instituto Butantan) e procedemos à sua classi-

ficação, valendo-nos, inicialmente, da chave sinóptica de Mello-Leitão, acrescida pelas espécies novas de Toledo Piza e Soares.

Em ordem de frequência, seguindo à risca aquela chave e os trabalhos dos outros dois colegas, encontramos naquele acervo as seguintes espécies:

*P. sorocabae, roseus, benedenii, cucullatus, rondoniensis, tetracanthus, holophaeus, melanocephalus, isabelinus, piracicabensis, cepnalopnoeus, mus, ypirangensis, urbanicolus, communis.*

Cumpre, porém, acentuar que em quase nenhum indivíduo houve concordância absoluta nos caracteres apontados pelos autores, de maneira que a determinação específica era apenas provável, em face das variações já expostas anteriormente.

Os machos, não puderam ser determinados, já que eram desconhecidos os métodos de sua especificação, com exceção de *P. communis* e *masculus,* descritos como novos por Toledo Piza, e de *ypirangensis* de Soares, três espécies novas, das quais não se conheciam as fêmeas.

Começamos, pois, abstraindo da classificação provisória, acima referida, a separar do grande número de exemplares deste gênero os machos das fêmeas. Depois dispuzemos sôbre uma grande mesa as fêmeas e, depois de bem secas (as cores naturais só aparecem bem, em estado seco), procedemos à sua separação em lotes, segundo o colorido geral, de fundo, e os desenhos ornamentais e ainda a cor dos pêlos, tendo especial cuidado em examinar não sómente o lado superior da caranguejeira como também o inferior.

Pudemos, desta maneira, reunir todas as fêmeas do gênero *Pamphobeteus* em cinco lotes, tendo cada lote um bom número de exemplares, alguns acima de 70.

Neste conjunto queremos acentuar, mais uma vez, que não se podem observar os desenhos ornamentais nem o colorido geral em animais submersos em alcool e, ainda menos, fóra do alcool, mas ainda molhados. Obter-se-iam, assim, cores fictícias bem diferentes das reais. Já Toledo Piza, ao descrever a *P. mus* diz: "A aranha no alcool é inteiramente negra; seca é de cor murina escura". (Para a boa observação é necessário analisar as aranhas, preferivelmente, quando vivas, ou pelo menos, em estado bem seco. Uma longa permanência em alcool prejudica sempre o colorido, fazendo desaparecer o verde oliva, o vermelho vivo (da fimbria dos palpos e dos pêlos do abdomen), o marrom escuro oliváceo (do cefalotorax e das pernas), o rosa (da orla do cefalotorax e dos aneis apicais das articulações das pernas) e o amarelo vivo (dos pêlos de algumas espécies), prevalecendo em animais deste gênero, longamente conservados em alcool uma cor difusa, uniforme, amarelo cinza).

Feita a separação em lotes, procedemos à procura de caracteres morfológicos constantes, verdadeiramente específicos, pois é claro que uma separação, sómente feita pelo colorido geral, ofereceria dados sistemáticos muito frageis e impossibilitaria a determinação de indivíduos, conservados no alcool por longo tempo.

Nesta procura de caracteres invariaveis que, ao lado do colorido, pudessem, com segurança, ser aproveitados na especificação destes lotes, tivemos em mira:

a) encontrar caracteres que não apresentassem diferenças entre uma aranha viva ou recente e uma, conservada por longo tempo em alcool;

b) encontrar caracteres, válidos não sómente para as fêmeas de *Pamphobeteus*, mas também para os machos, até hoje desconhecidos para 16 espécies do gênero.

Depois de muitos meses de trabalhos de medições, comparações, contagens de espinhos, aferições dos cômoros oculares, dos olhos, dos comprimentos totais e dos esternos decobrimos, de um lado, que todos estes caracteres (já anteriormente estudados detalhadamente) não tinham valor específico e, do outro lado os comprimentos do cefalotorax em relação ao comprimentos das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas constituem caracteres específicos realmente constantes, invariáveis mesmo em grandes séries e, portanto, de suma importância para a sistematização das espécies de *Pamphobeteus*.

Tanto o cefalotorax como as patelas e tibias são revestidas de camadas quitinosas muito espessas, de maneira que uma retração em meio alcoólico é muito pouco sensivel. Ainda mais, como não se trata mais de expressar estes comprimentos em números, mas sim, apenas a sua relação recíproca, está claro que mesmo após longa permanência das aranhas em meios conservadores, esta relação deveria ser sempre a mesma.

Finalmente, deveria esta relação de medidas ser constante não sómente para fêmeas, mas também para machos e, ainda, filhotes.

Encontramos, pois, na relação das medidas acima referidas caracteres específicos que permitem classificar com absoluta segurança fêmeas, machos e filhotes.

Para confirmar, de fato, a segurança destes novos caracteres, tomamos, então, o grande número de machos e os separamos inicialmente segundo o colorido (aliás muito mais uniforme do que nas fêmeas). Depois procedemos, como tinhamos feito nas fêmeas, às medições dos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas, encontrando absoluta concordância nas relações destas medidas com as das fêmeas.

Finalmente, para corroborar ainda mais a firmeza destes resultados, tiramos dos viveiros os respectivos machos e as fêmeas e os juntamos, temporariamente, no mesmo viveiro, e, de fato, êles procediam ao "jogo do amor", seguido por uma ou mais cópulas. É verdade, só pelo fato de copularem, não se pode concluir que se trate de uma mesma especie: mas, havendo concordância absoluta no colorido e nas relações das medidas biométricas e, ainda, no habitat (pois tanto uns como as outras provinham das mesmas localidades) a realização do ato sexual deve ser considerado um argumento convincente de se tratar de indivíduos da mesma espécie.

Na aferição da relação das medidas do cefalotorax e das patelas e tíbias I e IV é sempre bom medir não sómente os comprimentos das pernas de um lado, mas também do outro; pois, muitas vezes, estas medidas divergem, ainda que apenas por pouco. Igualmente é bom repetir estas medidas e proceder com muita cautela, porque só se pode admitir um erro de alguns deci-milímetros, mas nunca acima de meio milímetro.

O comprimento do cefalotorax é medido na linha longitudinal mediana, isto é, a partir da frente do cômoro ocular (*tumulus oculiferus*) até a reentrância, onde nasce o abdomen.

O comprimento das patelas e tíbias I e IV é tomado em conjunto, tomando-se as medições, quando as articulações estiverem completamente esticadas (para evitar o erro no cômputo da curvatura da patela).

Pois bem, seguindo nas separações dos lotes de *Pamphobeteus* o critério do colorido, obtivemos 5 lotes, como já dissemos, lotes esses incluindo tanto os machos como as fêmeas, e que podem ser divididos assim:

1. { Toda a aranha de colorido uniforme (ou cinza murina ou ferruginoso) ...... 2
   { Lado dorsal de colorido diferente do lado ventral ...................... 3

2. { Cor geral cinza murina, inclusive a das pernas — *P. tetracanthus*
   { Cor geral, inclusive a das pernas, ferruginoso, ora mais para o vermelho ora mais para o ferruginoso escuro (principalmente no abdomen) — *P. cesteri*

3. { Lado dorsal (cefalotorax, abdomen e pernas) da cor do monho mais claro ou mais escuro (às vezes quase preto, principalmente no cefalotorax); lado ventral (esterno, coxas das pernas e ventre) castanho cinza — *P. sorocabae*
   { Lado dorsal cor de monho; lado ventral ou inteiramente concolor, escuro, quase preto ou o cefalotorax e as coxas cinza e o ventre preto ........... 4

4. { Lado ventral (esterno, coxa e ventre) concolor, escuro, quase preto — *P. roseus*
   { Esterno e coxa cor castanho cinza; ventre preto — *P. rondoniensis*.

Na presente chave sinóptica só se tomam em consideração as cores principais, i. é. as que dão na vista do espetador como sendo de franca predominância e como se pode ver bem nos desenhos coloridos, que acompanham este trabalho.

É sempre de bom aviso, principalmente neste gênero, em que predomina uma monotonia de colorido muito grande, não se perder em detalhes na descrição de pêlos ornamentais, principalmente nas linhas e estrias das pernas; pois, do contrário se incidiria no mesmo erro antigo da criação de muitas espécies novas, por causa de variações individuais dos coloridos.

Julgamos útil, pelo mesmo motivo, descrever aqui os coloridos das 5 espécies acima com um pouco mais de detalhe:

a) *Detalhes de coloridos e desenhos comuns às 5 espécies, machos e fêmeas*:

Fimbria dos palpos maxilares e dos lábios castanho avermelhado, ora mais para o amarelo ora mais para o vermelho;

Desenhos das pernas — fêmures com duas estrias dorsais claras, paralelas, a percorrer toda a extensão da articulação, bem visíveis em *roseus* e *sorocabae* (fêmeas) e *rondoniensis*, mal visíveis em todos os machos das 5 espécies e nas fêmeas de *tetracanthus* e *cesteri* (razão esta porque foram feitas espécies novas, caracterizadas pela ausência destas estrias).

Patelas com duas estrias dorsais, que formam a continuação das dos fêmures e que convergem no lado apical da patela; direitas nas duas pernas anteriores; bastante recurvas nas duas pernas posteriores. São muito bem visíveis nas espécies *roseus, sorocabae, rondoniensis* e bastante mal visíveis em todos os machos e nas fêmeas de *tetracanthus* e *cesteri*. (Em exemplares velhos estas estrias são quase completamente destituidas de pêlos e se apresentam "nuas" pelo desgaste sofrido pelo hábito de que a aranha, em estado encolhido, repousam sôbre as patelas — outro fato já descrito por especialista como sendo um caracter de uma espécie nova).

Tíbias com duas estrias dorsais claras que começam um pouco distante do lado basal da articulação e se estendem até o ápice, convergindo ligeiramente no lado apical. São bem visíveis nos machos e fêmeas de *roseus, sorocabae* e *rondoniensis;* mais ou menos visíveis nas fêmeas de *tetracanthus* e *cesteri* e bastante mal visíveis em seus machos.

No lado interno das estrias, contiguo a elas, existem duas faixas escuras, quase pretas que, formando um semi-anel látero-dorsal no lado basal da articulação, acompanham a direção das duas estrias claras e terminam no terço apical. Estas faixas escuras são melhor visíveis nas aranhas claras, portanto, em *cesteri, rondoniensis*, machos e fêmeas; depois em *sorocabae* e roseus, principalmente nas

duas pernas anteriores. São mal visíveis em *tetracanthus*, machos e fêmeas e nos machos de *sorocabae* e *roseus*. Em todas as cinco espécies são sempre mais nítidas nas pernas anteriores e muito menos nas posteriores.

Metatarsos no lado dorsal, na zona basal, com uma estrias clara ímpar, curta, não atingindo nem a metade desta articulação. Muito bem visível em *roseus* (fêmeas) e em *rondoniensis* (fêmea), embora também nestas duas espécies esta estria esteja mal visível principalmente na última perna. Em todos os machos e nas fêmeas de *sorocabae*, *tetracanthus* e *cesteri* não existe a estria clara. O metatarso das 5 espécies de *Pamphobebeteus*, tanto machos como fêmeas é percorrido por uma faixa escura dorsal, sinuosa, em forma de "S" e que principia no lado basal externo com uma mancha mais grossa e percorre em sinuosidade toda a articulação. Em *cesteri* esta faixa é marrom escuro. Tarsos com uma faixa dorsal larga, da mesma cor da faixa sinuosa dos metatarsos, com forma oval, tendo no meio uma estria mais clara Esta faixa com a estria interna é bem visível em todos os machos e fêmeas das cinco espécies.

Nas articulações dos fêmures, patelas, tíbias e metatarsos, no lado apical, há nas cinco espécies, machos e fêmeas, aneis apicais de pêlos bem mais claros do que o ambiente; cor de rosa até cor de tijolo em *sorocabae*, *roseus* e *rondoniensis*; cinza claro em *cesteri* e *tetracanthus*. Em todas as aranhas do presente género estes aneis são sempre mais delicados e menos desenvolvidos nos fêmures, acentuando-se progressivamente em direção às articulações terminais.

b) *Descrição do colorido específico*:

1) *Pamphobeteus sorocabae* — Mello-Leitão, 1923 — Cefalotorax, abdomen e fêmures no lado dorsal marron escuro até quase preto. Pêlos da orla do cefalotorax, das pernas e do abdomen cor de rosa. Esterno, coxas, trocanteres e fêmures e ventre de cor ferruginosa. Lábio e maxilares castanhos com orla de longos pêlos cor de tijolo. Pêlos do esterno, das pernas e do ventre rosa ferrugem, portanto, um nada mais escuros do que os pêlos do lado dorsal. Patelas, tibias, metatarsos e tarsos, no lado ventral, da mesma cor como no lado dorsal, i.é. marrom escuro, com reflexos esverdeados em alguns exemplares, principalmente nas duas pernas anteriores.

Em alguns exemplares velhos o marrom escuro do cefalotorax apresenta tonalidades escuras para o verde cinza. O mesmo colorido geral apresentam *P. melanocephalus Mello-Leitão*, 1923 e *P. communis* Piza, 1939.

2) *Pamphobeteus roseus* — Mello-Leitão, 1923 — Cefalotorax, abdomen e pernas no lado dorsal marron escuro até quase preto, portanto igual ao de so-

rocabae, com nuances distintivas tão pouco pronunciadas que, observando-se exemplares das duas espécies apenas do lado dorsal, não se consegue distingui-las com segurança. O cefalotorax pode apresentar a zona frontal bem mais escura do que o resto da placa (vide descrição de Piza — P. cephalopheus). Pêlos róseos nos aneis apicais das articulações das pernas e em volta da orla do cefalotorax. Os pêlos das pernas e do abdomen mais cor de tijolo. Esterno, coxas, trocanteres, fêmures e ventre uniformemente escuro, quase preto, com pêlos escuros também, ainda que mais claros que a cor de fundo. Patelas e tíbias (no lado ventral) com abundantes pêlos longos cor castanha clara. Escópulas dos tarsos e metatarsos esverdeadas. Lábio e maxilas castanho escuros com pêlos vermelho vinhoso. Pelo colorido a *P. cephalopheus* Piza, 1944 é identica com *roseus*. O colorido do macho de *roseus*, até agora desconhecido para a ciência, mas muito frequente na nossa coleção, também não precisa ser descrito em detalhes, porque é idêntico ao da fêmea, com exceção das estrias e faixas das pernas serem menos visíveis do que naquela, como já temos acentuado anteriormente (vide desenho colorido).

3) *Pamphobeteus rondoniensis* — Mello-Leitão, 1923 — Cefalotorax, abdomen e pernas no lado dorsal marron escuro. O abdomen mais escuro que o cefalotorax. Pêlos da orla do cefalotorax, das pernas e do abdomen flavos, com tonalidades para o vermelho, principalmente no abdomen (vide desenho colorido). Faixas e listras das pernas como já foi descrito acima. Esterno, coxas, trocanteres e fêmures castanhos escuro até cinza ferruginoso, muitas vezes bem parecido com as cores de *sorocabae*. Ventre marron escuro, quase preto. Lábio e maxilares como em *roseus*. Pêlos vermelho flavos. Pêlos do esterno e das pernas (ventralmente) acompanhando a cor de fundo, i.é, castanhos ou cinza ferruginosos. Os do ventre quase vermelhos, sendo de notar que na zona mediana ventral há uma área distribuida de pêlos longos. Tibias, metatarsos e tarsos com densos pêlos cinza, com reflexos verdes. Escópulas esverdeadas, escuras (vide desenho colorido).

4) *Pamphobeteus tetracanthus* — Mello-Leitão, 1923 — A aranha inteira, dorsal e ventralmente, cinza murina, escura (vide desenho colorido), inclusive os pêlos de todo o corpo e das pernas. Apenas o ventre é ainda pouco mais escuro. Lábio e maxilas castanho escuro, com orla de pêlos vermelho tijolo. Estrias e faixas como já descritas.

Com *tetracanthus* é sinônima pelo critério do colorido (e por outras medidas que veremos depois) o *P. mus* Piza, 1944. O macho, apresentado no presente

trabalho como novo para a ciência, obedece no colorido geral e dos pêlos às mesmas tonalidades da fêmea, de maneira que dispensa descrição mais detalhada.

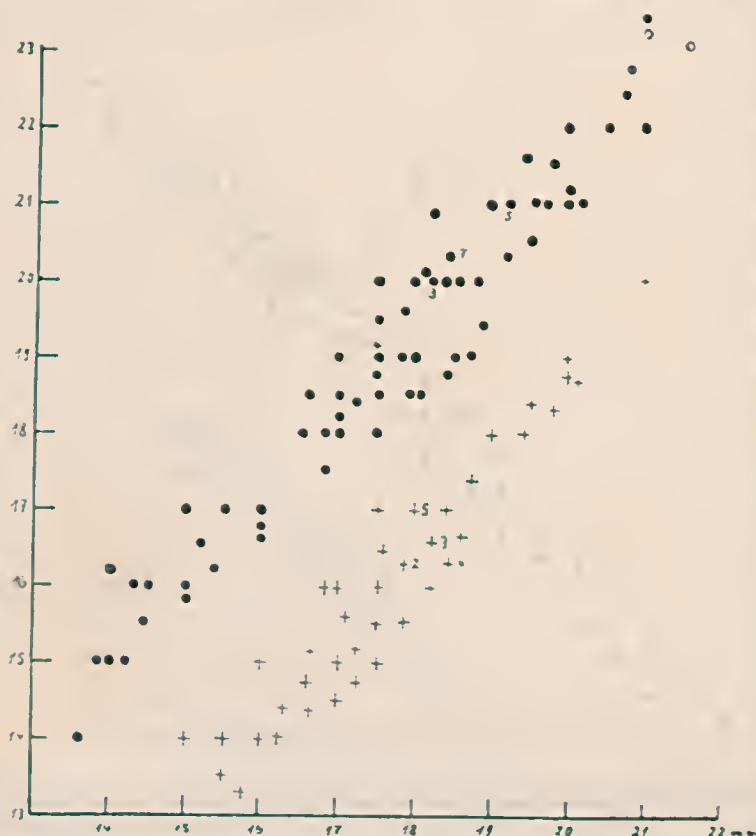
5) *Pamphobeteus cesteri* — Mello-Leitão, 1923 (vide desenho colorido) — Toda a aranha dorsal e ventralmente, inclusive as pernas de cor castanha ou ocrácea ou ainda pardo ferrugínea. Pêlos das pernas, do cefalotorax e do abdomen castanho avermelhados ou castanho ferruginosos. Faixas e listras das pernas como já descritas, inclusive os aneis apicais das pernas. Lábio e maxilas castanhos com fimbria de pêlos vermelhos.

O abdomen, apresenta quando a aranha perdeu os pêlos longos avermelhados (pelo hábito de fazer afugentar um inimigo) uma penugem escura, marron escuro. Tem o mesmo colorido como *cesteri* e são sinônimos a ela (por outros caracteres também, — *P. cucullatus* M. L., 1923; *P. holophoeus* M. L., 1923; *P. exsul* M. L., 1923; *P. urbanicolus* Soares, 1941; *P. ypirangensis* Soares, 1941; *P. piracicabensis* Piza, 1933.

O macho de *cesteri*, muito frequente na coleção do Instituto Butantan, foi descrito em primeira mão por Piza, sob o nome de *P. piracicabensis*. Não necessita ser descrito mais uma vez aqui, porque seu colorido é igual ao da fêmea, com a diferença de que no aspecto geral prevalecem os tons cinza ferruginosos, também nos pêlos. (Temos a duvida de que *cesteri* seja idêntica com *P. isabellinus* (Ausserer), 1871, cujo colorido foi descrito por aquele autor como sendo pardo amarelado ou ocráceo e ocráceo ferruginoso no esterno e no ventre, portanto, bastante igual ao de cesteri. Como não dispomos do tipo, nem sabemos onde encontrar uma descrição do mesmo, deixamos esta questão aberta, por enquanto).

Como se vê, acentuamos apenas o colorido principal, que cai na vista e permite distinguir desde logo qualquer uma das 5 espécies citadas.

Existem além do colorido para a especificação segura das espécies *Pamphobeteus*, as relações das medidas dos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas. Trataremos disto agora. Primeiro, porém, devemos chamar a atenção sôbre o dimorfismo sexual entre os machos e as fêmeas, dimorfismo este tão pronunciado e tão característico que não se pode fazer valer, por exemplo, a relação de comprimento entre o cefalotorax e a patela e tibia do primeiro par de pernas, para demonstração que um determinado indivíduo masculino pertença à mesma espécie como um indivíduo fêmea, ainda que ambos tenham o mesmo colorido.

Na tabela I é demonstrado este dimorfismo sexual, pertencendo tanto os machos como as fêmeas, aí enumerados, às 5 espécies, a saber: *P. roseus, sorocabae, tetracanthus, cesteri* e *rondoniensis*.

A tabela demonstra claramente os seguintes dois fatos:

a) Nos machos de qualquer espécie de *Pamphobeteus* as patelas e tíbias do primeiro par de pernas sempre são mais longas do que o comprimento do cefalotorax.

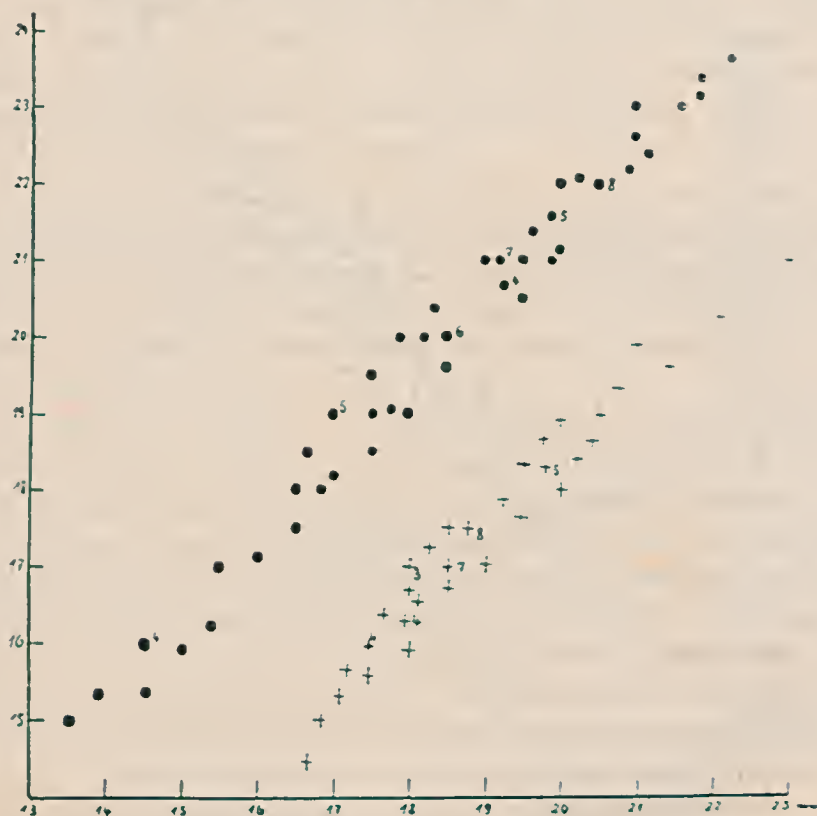
b) Nas fêmeas de qualquer das espécies aqui tratadas o cefalotorax sempre é maior do que as patelas e tíbias do primeiro par de pernas.

Este dimorfismo sexual é apresentado mais detalhadamente pelas tabelas II, III, IV e V, referindo-se sucessivamente aos machos e às fêmeas de *P. sorocabae* (II), *roseus* (III) *tetracanthus* (IV e *cesteri* (V).

Infelizmente, não nos foi possível obter, até hoje, mais de um macho de *P. rondoniensis*, mas também nesta espécie existe o mesmo dimorfismo sexual. Nesta espécie. aliás temos muito poucas fêmeas, vindas do Mato Grosso.

TABELA II

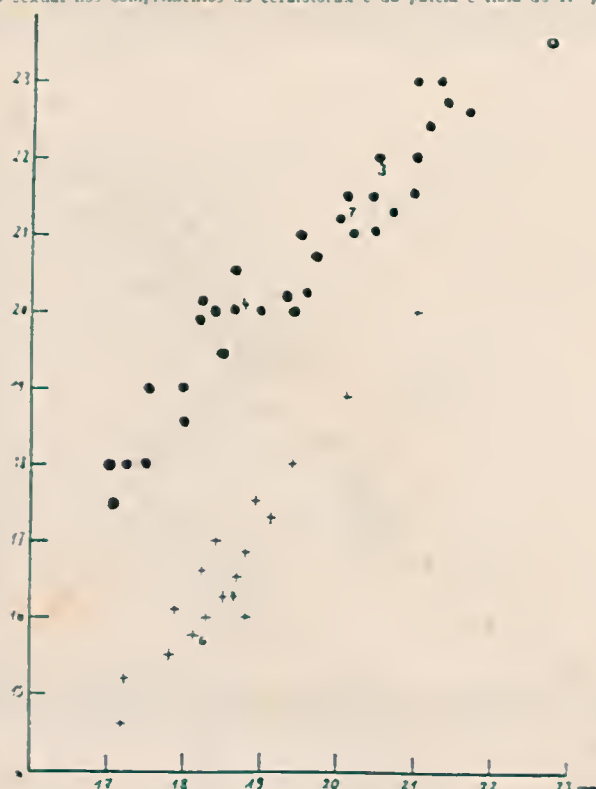
Pamphobeteus sorocabae ● fêmeas + machos

Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e da patela e tibia do 1.º par de pernas

Comparando as tabelas, compreende-se como os especialistas, em face da grande divergência nas medidas do cefalotorax e das patelas e tíbias I, não souberam colocar os machos na devida espécie, mas estabeleceram-nos como espécies novas, com fêmeas desconhecidas (*P. ypirangensis* Soares e *P. communis* Piza).

Si, ao contrário, o especialista toma o colorido geral da aranha (aranha viva ou cloroformizada) como ponto de saida, seguindo as normas acima apontadas, então êle já consegue reunir os machos e as fêmeas e especifica-los. Adotando, em seguida, como caracter específico constante a relação do comprimento entre as patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas, então êle vê confirmado o caracter do colorido, pelo menos nas fêmeas (também nos machos, só que nestes últimos as cores são menos nitidas).

TABELA III

Pamphobeteus roseus ● fêmeas + machos

Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e da patela e tibia do 1.º par de pernas

A relação do comprimento das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas forma uma perfeita curva, incluindo tanto os machos como as fêmeas, curva esta diferente para cada espécie, como se pode inferir da comparação das medidas da tabela VI.

Nesta tabela as espécies *P. roseus, sorocabae* e *rondoniensis* aparecem:

a) nitidamente distintas umas das outras,

b) os machos uniformes às fêmeas da mesma espécie.

As espécies *P. tetracanthus* e *cesteri* cairiam, segundo este critério, dentro da curva de *sorocabae*. Uma confusão, porém, não é possivel devido à diversidade absoluta do colorido das três espécies.

Ademais *P. cesteri* é muito menor, de maneira que um exemplar bem adulto no máximo vem a atingir o tamanho de um exemplar médio de *sorocabae*, como se pode ver bem comparando as espécies na tabela VII.

TABELA IV

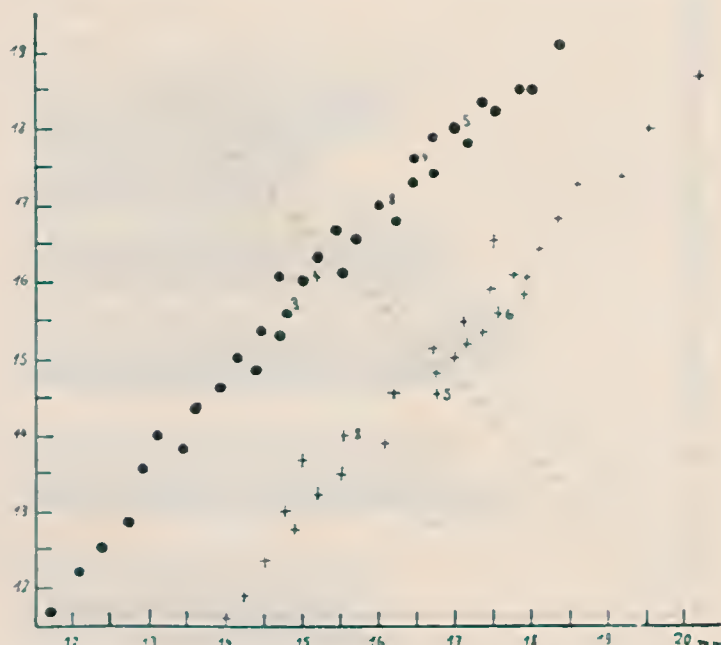
Pamphobeteus tetracanthus ● fêmeas + machos

Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibias do 1.° par de pernas

Além dos dois caracteres, o do colorido e do tamanho, há ainda um terceiro caracter específico para *cesteri* e que consiste na pouca diferença de relação entre o comprimento do cefalotorax e o da patela e tíbia do primeiro e do quarto par de pernas (vide tabela VII). Em *cesteri*, comparando-se estas medidas numa grande série, tanto de machos como de fêmeas, nas últimas principalmente, observa-se comprimento igual entre o cefalotorax e as patelas e tíbias das pernas (conf. medidas de *piracicabensis* Piza).

Para *tetracanthus*, entretanto, só conseguimos, seguindo o mesmo critério, apontar nitidamente o dimorfismo sexual (tabela IV) expresso na relação e a

TABELA V

Dimorfismo sexual nos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tíbias do 1.º par de pernas

concordância específica dos machos e das fêmeas no tocante à relação das medidas dos comprimentos das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas (vide tabela VII). Mas isto é o suficiente, uma vez que o colorido desta espécie (cinza murino) a destaca nitidamente e sem dúvida de confusão, tanto de *sorocabae* com de *cesteri*, enquanto que de *roseus* e de *rondoniensis* ela se distingue relações bem diversas dos comprimentos entre o cefalotorax e as patelas e tíbias das pernas.

Tomando por base, além do colorido, as relações de medidas, expressas graficamente nas tabelas anteriores e procedendo à revisão dos tipos, das novas espécies, chegamos novamente à conclussão de que *P. melanocephalus* Mello-Leitão, 1923 e *P. communis* Piza, 1939 são sinônimas de *P. sorocabae* Mello-Leitão, 1923.

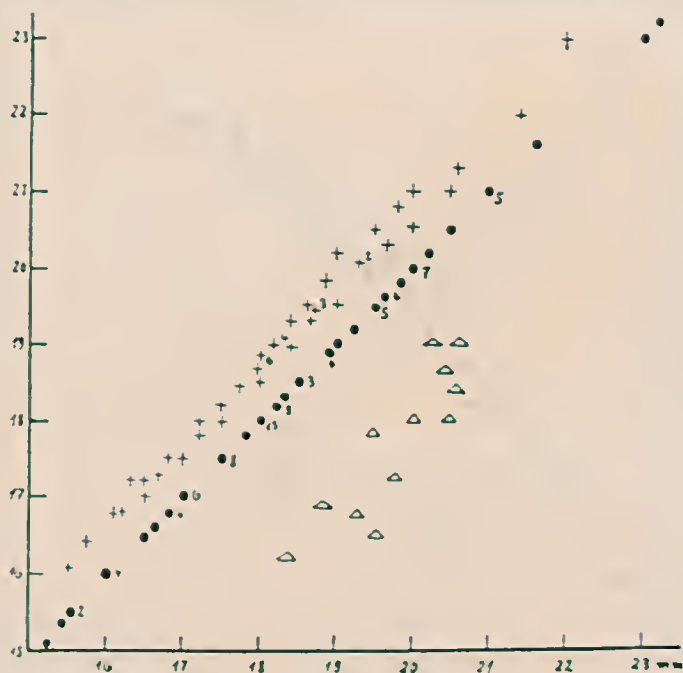
*P. cephalopheus* Piza, 1944 é sinônima de *P. roseus* Mello-Leitão, 1923.

*P. nus* Piza, 1944 é sinônima de *P. tetracanthus* Mello-Leitão, 1923.

*P. cucullatus* Mello-Leitão, 1923,

TABELA VI

+ Pamphobeteus roseus ● P. sorocabae △ P. rondoniensis

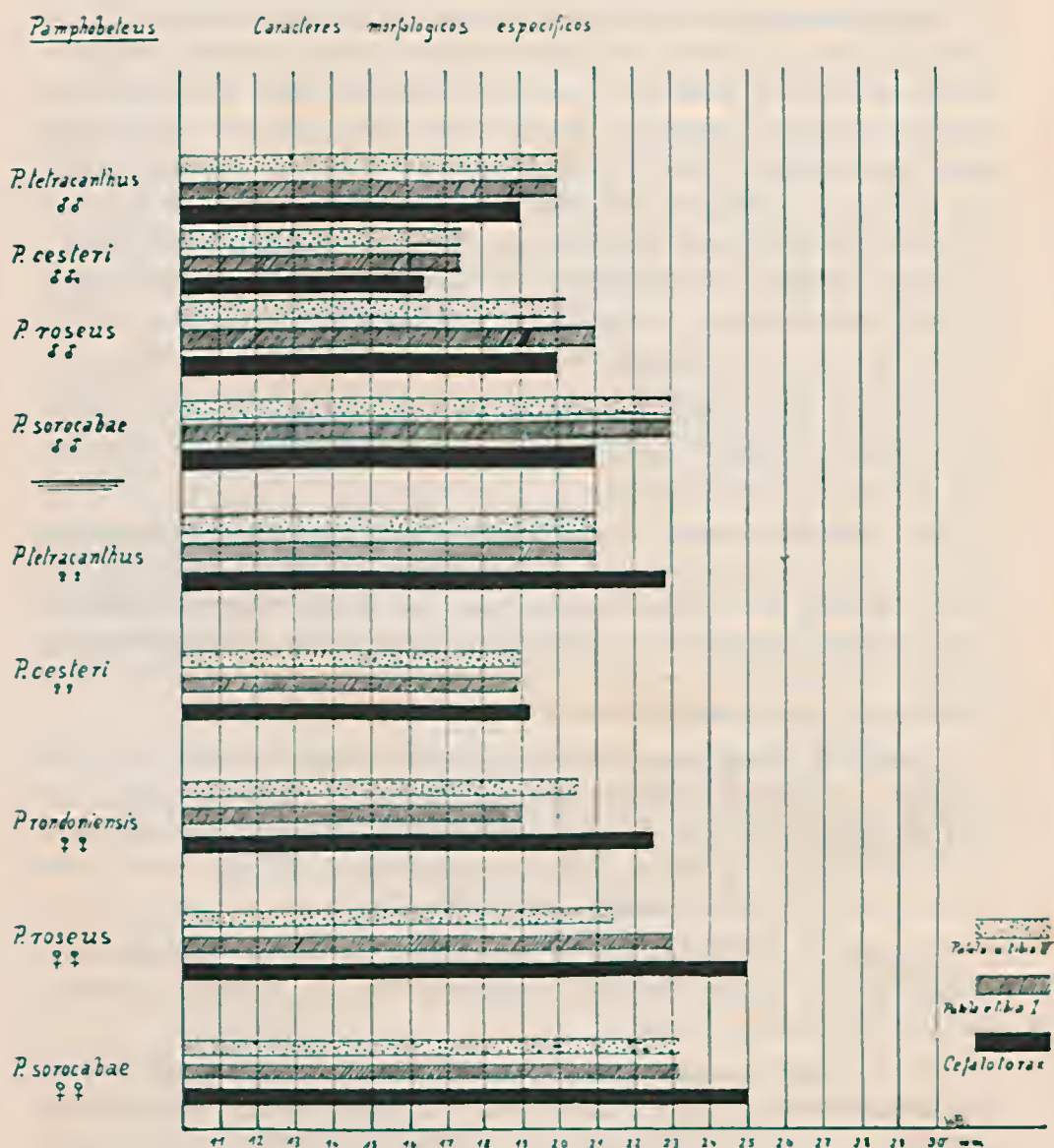
Relação das medidas de comprimento entre as patelas e tibias do 1.° e do 4.° par de pernas

*P. exsul* Mello-Leitão, 1923,

*P. holophaeus* Mello-Leitão, 1923,

*P. piracicabensis* Piza, 1933,

*P. urbanicolus* Soares, 1941 e *P. ypirangensis* Soares, 1941 são sinônimas de *P. cesteri* Mello-Leitão, 1923 (deixando, por ora aberta a questão, si *P. cesteri* não é por seu turno sinônima de *P. isabellinus* (Ausserer), 1871 o que nos parece muito provável).

Assim das espécies brasileiras do gênero *Pamphobeteus* restam apenas, além das cinco espécies boas, a *P. platyomma*, *P. insularis* e *P. anomalus* Mello-Leitão, 1923; *P. benedenii* Bertkau, 1880 e *P. masculus* Piza, 1939. *P. benedenii* Bertkau não nos parece ser *Pamphobeteus*, pois apresenta medidas absolutamente anormais para as spécies deste gênero, coincidindo, porém, estas medidas com o gênero *Lasiodora*. De fato, Bertkau chamou sua espécie de *Lasiodora benedenii*. A questão só poderia ser resolvida satisfatóriamente, si se pudesse obter o tipo.

TABELA VII

*Pamphobeteus platyomma* Mello-Leitão, 1923, foi mal caracterizada pelo autor, pois em sua chave sinóptica das espécies deste género o autor insiste principalmente no fato da diversidade do comprimento e da largura do cômoro ocular. "Rima ocular muito baixa, duas vezes mais larga do que longa-platyomma.

Revendo o tipo existente na coleção no Departamento de Zoologia em São Paulo, sob o N°. 155, encontramos apenas as seguintes medidas do cômoro ocular: 1, 9 mm de comprimento por 2,4 mm de largura no exemplar maior e 1, 5 mm de comprimento por 1, 9 mm de largura no menor, portanto, a rima ocular também nesta espécie é apenas um pouco mais larga que longa, como nas outras espécies do gênero. Já por este motivo, dada a grande ênfase, atribuida pelo autor a este caracter, a espécie não pode ser considerada boa. Quanto à relação das medidas do comprimento do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas, anunciadas por Mello-Leitão como sendo 18 para o cefalotorax, 16.5 para a patela e tibia I e 18 para a patela e tibia IV, verificamos, de fato, concordância nos comprimentos do cefalotorax e da patela e tibia IV, sendo a patela e tibia I um pouco menor.

*Pamphobeteus insularis* Mello-Leitão, 1923 pela remedição dos comprimentos do cefalotorax, das patelas e tíbias I e IV, apresenta praticamente a mesma relação de medidas como *platyomma*.

É interessante, neste conjunto, constatar que Piza, em 1939, descreveu primeiro um macho, denominando-o *P. masculus*, que vem a concordar, nas citadas medidas, com as duas espécies acima, isto é, que apresenta também as patelas e tibias do primeiro par de pernas menores do que as do quarto par de pernas. O comprimento menor do cefalotorax de *masculus* é a expressão do dimorfismo sexual, como já vimos.

Quanto ao colorido geral das três espécies há igualmente uma grande concordância. *Platyomma, insularis, masculus* apresentam cefalotorax negro, com orla de longos pêlos róseo-cinza ou fulvo escuros. Abdomen castanho negro, com pêlos flavos avermelhados. Esterno e ancas das pernas pardo-escuro, quase cor de monho, inclusive o ventre, ornados de pêlos flavos.

Finalmente, existe uma relativa concordância no habitat, pois *platyomma* provêm da Ilha de São Sebastião, *masculus* da Ilha dos Alcatrazes e *insularis* da Ilha da Queimada Grande.

As três espécies seriam, portanto, também reunidas numa só, que deve ser denominada de *P. platyomma* Mello-Leitão. A nossa suspeita da grande afinidade destas três espécies, baseada nas medidas e no colorido geral, é confirmada pelo fato de ter sido encontrado um exemplar, infelizmente muitíssimo mutilado, ainda que reconhecivel, na Ilha da Queima Grande, numa excursão organizada pelo Instituto Butantan em fevereiro de 1947. Finalmente, recebemos três exemplares, machos, iguais ao descrito por Piza, com habitat na Praia Grande e em Santos (Estado de São Paulo). Assim, torna-se bem

provável a hipótese de que as três espécies representam uma só, com habitat no litoral do Estado de São Paulo e do Rio, inclusive as Ilhas praianas.

Os caracteres morfológicos constantes destas três espécies, reunidas sob o nome de *P. platyomma*, seriam: patela e tíbia do primeiro par de pernas menores do que os do quarto par de pernas (nos machos e nas fêmeas). Cefalotorax igual às patelas e tíbias do quarto par de pernas, nas fêmeas e maior do que as patelas e tíbias do primeiro par de pernas; nos machos o cefalotorax menor do que as patelas e tíbias do primeiro par de pernas.

Entretanto, para ver plenamente confirmada a nossa suspeita, aliás bem fundada, será necessário obter ainda maior número de exemplares, o que esperamos conseguir em futuro próximo.

Quanto a *Pamphobeteus anomalus* Mello-Leitão, 1923, cremos tratar-se realmente de uma boa espécie, tanto pelo colorido negro uniforme em todo o corpo como pelas medidas do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas, cuja relação é a seguinte: 22,2:24,5:26, mm. Mas como não conseguimos encontrar o tipo, existente, segundo Mello-Leitão, no Departamento de Zoologia em São Paulo, nada de positivo, por ora, se poderá resolver, ainda mais por não existirem outros exemplares.

Chave sinóptica das espécies mais comuns do gênero *Pamphobeteus*:

*A. Chave das fêmeas*

1. { Cefalotorax bem maior (pelo menos 1 mm) do que as patelas e tíbias do 1.º e 4.º par de pernas .......... 2
   Cefalotorax igual ou apenas pouco maior (menos 1 mm) do que as patelas e tíbias do 1.º e do 4.º par de pernas. Colorido beral uniforme, ocráceo ferruginoso, com abdomen muitas vezes mais escuro — *P. cesteri*.

2. { Patela e tíbia 1 maior do que a patela e tíbia 4 .......... 4
   Patela e tíbia 1 do mesmo comprimento do que a patela e tíbia 4 .......... 3

3. { Colorido do corpo inteiro (lado dorsal e ventral) uniforme, cinza murino ou cinza ferruginoso, no abdomem com tons brilhantes — *P. tetracanthus* Mello-Leitão.
   Colorido superior (cefalotorax, pernas, abdomen) cor de monho escuro, às vezes quase preto; esterno, coxa e ventre cinza ferrugem; o ventre às vezes mais ferruginoso — *P. sorocabae* Mello-Leitão.

4. { Patela e tíbia I menor do que a patela e tíbia IV; colorido no lado dorsal igual ao de *P. sorocabae*; esterno, ancas e ventre enegrecidos — *P. roseus* Mello-Leitão.
   Patela e tíbia I menor do que a patela e tíbia 4, colorido no lado dorsal igual ao de *P. sorocabae*; esterno e coxas ferruginosos ou cinzentos; ventre castanho escuro até enegrecido — *P. rondoniensis* Mello-Leitão.

*B. Chave dos machos*

1. { Patela e tíbia I maior ou menor do que patela e tíbia IV ............... 2
   Patela e tíbia I igual à IV ........................................ 3

2. { Patela e tíbia I maior do que IV. Colorido igual ao de *P. roseus* fêmea. Esterno, coxas e ventre menos enegrecidos, às vezes, do que nas fêmeas — *P. roseus*.
   Patela e tíbia I menor que a IV. Colorido igual ao da fêmea — *P. rondoniensis*.

3. { Colorido uniforme cinza murino ou marrom ocráceo .................... 4
   Colo rido dorsal diferente do ventral ................................ 5

4. { Toda a aranha cinza murina uniforme — *P. tetracanthus*.
   Toda a aranha marrom ocrácea, com o abdomen, às vezes, mais escuro — *P. cesteri*.

5. { Cefalotorax, abdomen e pernas cor de monho, quase preto; esterno, coxa e ventre cinza — *P. sorocabae*.

Como se vê, repousa a chave sinóptica sôbre a relação das medidas do comprimento do cefalotorax e das patelas e tíbias do primeiro e do quarto par de pernas e sôbre o colorido geral. Estes critérios têem demonstrado serem certos, porque foram estabelecidos à mão de centenas de exemplares.

Desta maneira, das 19 espécies, até agora conhecidas, só restam cinco espécies, realmente boas e facilmente distinguíveis, já à vista desarmada e sem auxílio da lupa. Apenas a espécie *P. rondoniensis,* ainda que esteja já muito bem definida, e com um habitat restrito a uma zona geográfica peculiar (Mato Grosso), necessitaria ainda de maior número de exemplares (temos apenas 1 macho e uma dezena de fêmeas, mais ou menos). Sôbre o grupo *platyomma, insularis* e *masculus* ainda não estamos aptos a proferir algo de definitivo e ainda menos sôbre *anomalus*.

## DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O género *Pamphobeteus* encontra-se em todo o Estado de São Paulo e nos Estados vizinhos. A relativa raridade nos outros Estados, parece-nos ser apenas o resultado destas zonas serem menos exploradas, isto é, de não existirem lá fornecedores do Instituto Butantan, de maneira que é de supor que, com o correr dos anos encontrar-se-ão também nos outros Estados exemplares deste género.

No Estado de São Paulo, em ordem de frequência das capturas e pela distribuição geográfica dos locais das capturas, pode-se concluir que *P. sorocabae* existe em todo o Estado, sendo rara, entretanto, no litoral; *P. roseus* existe igualmente em todo o Estado, inclusive no litarol; *P. tetracanthus* já é mais rara do

que as duas anteriores, mas existe até na Capital de São Paulo; *P. cesteri* tem o mesmo habitat de *tetracanthus*, sendo, entretanto, ainda mais rara do que esta; *P. rondoniensis* já foi encontrada: um exemplar em Piracicaba, um outro em Artemis e todos os outros em Taunay (Mato Grosso), sendo o macho de Terenos, do mesmo Estado.


RESUMO

O presente trabalho representa uma revisão crítica e sistemática das espécies brasileiras do gênero *Pamphobeteus* Pocock. Tendo por base um grande número de exemplares deste gênero, são apresentados como falhos e inaproveitáveis para a boa sistematização das espécies os seguintes caracteres, até agora aproveitados pelos especialistas: dimensões dos cômoros oculares; posição e tamanho dos olhos; comprimento total e das pernas; largura do cefalotorax e do esterno; posição e forma da fóvea torácica e das últimas sigilas; número e posição dos espinhos das pernas.

Igualmente, à mão do mesmo material, estudado comparativamente, foram reconhecidos como tendo grande valor sistemático específico, o colorido geral juntamente com a relação das medidas dos comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas. Segundo estes característicos foram reestudados os tipos descritos pelos autores, drs. Mello-Leitão, S. T. Piza e B. M. Soares, chegando-se à conclusão de que entre as 19 espécies até agora descritas para o Brasil, apenas 5 são realmente validas permanecendo uma VIa. e uma VIIa. por enquanto duvidosas.

São as seguintes as espécies validas com as respectivas sinônimias:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1) | *P. roseus* Mello-Leitão, 1923 | Sinônimas: | *P. cephalopheus* Piza, 1944. |
| 2) | *P. sorocabae* Mello-Leitão, 1923 | Sinônimas: | *P. melanocephalus* Mello-Leitão, 1923 e *P. communis* Piza, 1939. |
| 3) | *P. cesteri* Mello-Leitão, 1923 | Sinônimas: | *P. cucullatus* Mello-Leitão, 1923; *P. holophaeus* Mello-Leitão, 1923; *P. exsul* Mello-Leitão, 1923; *P. urbanicolus* Soares, 1941. *P. ypirangensis* Soares, 1941 *P. piracicabensis* Piza, 1933 |
| 4) | *P. rindoniensis* Mello-Leitão, 1923 | | *P. mus* Piza, 1944. |
| 5) | *P. tetraconthus* Mello-Leitão, 1923 | Sinonima: | |

A espécie ainda mal definida, por falta de maior número de exemplares é a que reune a *P. platyomma* e *insularis* Mello-Leitão, 1923 e *P. masculus* Piza, 1939 sob o nome de *P. platyomma* Mello-Leitão, 1923.

*P. anomalus* Mello-Leitão, 1923 carece ainda de ulterior confirmação à mão de novo material. *P. benedenii* Bertkau parece ser uma *Lasiodora*. *P. isabellinus* Ausserer, 1871, é reconhecida como sendo espécie valida, dada a sua prioridade absoluta dentro das espécies deste género. E' quase certo que com ela é sinônima a *P. cesteri*. Mas a questão só poderá ser resolvida definitivamente, quando se tiver conhecimento do paradeiro do tipo.


## ZUSAMMENFASSUNG

In obiger Arbeit wird eine kritische Revision der brasilianischen Arten des Genus *Pamphobeteus* Pocock, an Hand von zahlreichen Exemplaren, dargelegt. Die bisher von den Zpezialisten angewandten Markmale, wie der Aughuegel; die Stellung und Groesse und Abstaende der Augen; die totale Laenge und die Laenge der Beine; die Breite des Cephalothorax und des Sternums; die Lage und die Form der Thoraxgrube; die Zahl und Lage der Dornen an den Beinen-werden vergleichend kritisch untersucht und es wird bewiesen, dass sie keine apezifischen Merkmale darstellen, wenigstens nicht im Genus *Pamphobeteus*, weil sie zu grossen individuellen Varationen unterworfen sind.

Positiv wird dabei festgestellt, dass gerade die allgemeine Faerbung ein sehr wichtiges spezifisches Merkmal darstellt, das, zusammen mit den Beziehungen der Laengenmasse des Cephalonorax und der Patellen und Tibien der ersten und letzten Beinpaare, zur spezifischen Unterscheidung der Arten unbedingt zuverlaessig ist.

An Hand der neuen Merkmale werden die 19 Arten des Genus *Pamphobeteus*, mit Hilfe von mehr als 600 Exemplaren, neu bestimmt und auf folgende 5 Arten reduziert:

1) *P. roseus* Mello-Leitão, 1923 — Syn.: *P. cephalopheus* Piza, 1944.
2) *P. sorocabae* Mello-Leitão, 1923 — Syn.: *P. melanocephalus* Mello-Leitão und communis Piza;
3) *P. cesteri* Mello-Leitão — Syn.: *cucullatus, holophaeus, exsul* Mello-Leitão; *urbanicolus, ypirangensis* Soares; *piracicabensis* Piza.
4) *P. rondoniensis* Mello-Leitão, 1923
5) *P. tetracanthus* Mello-Leitão, 1923 — Syn.: *P. mus* Piza.

Zwischen *platyomma, insularis* und *masculus* wird eine weitgehende Uebereinstimmung in Farbe, Massen und habitat gefunden und der gut begruendete Verdacht ausgesprochen, dass es sich bei diesen drei Arten nur um eine Art handelt, die den Namen *P. platyomma* Mello-Leitão, 1923 fuehrt.

Ebenso wird der Verdacht ausgesprochen, dass *P. cesteri* sehr wahrscheinlich synonym sein wird mit *P. isabellinus* Ausserer. *P. anomalus* Mello-Leitão, 1923 scheint zwar eine gute Art zu sein, konnte aber leider hier nicht naeher behandelt werden, einerseits weil der Typ nicht mehr aufgefunden wurde und andererseits, weil nur ein einziges Exemplar, ein Weibchen, beschrieben wurde. *P. benedenii* Bertkau konnte nicht revidiert werden, weil, wie bei *isabellinus*, weder der Typ noch eine originelle Beschreibung dieser Art zu haben war.

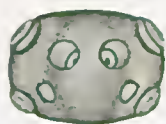
In gegenwaertiger Arbeit werden auch die Maennchen, soweit sie bisher unbekannt waren, neu beschrieben und der sexuelle Geschlechtsunterschied zwischen Maennchen und Weibchen wird hier zum ersten Male dargelegt. Ausserdem bringt dieser systematische Beitrag neue Schluessel zur sicheren Bestimmung der Arten des Genus *Pamphobeteus*, geltend fuer Maennchen und Weibchen, womit der synoptische Schluessel von Mello-Leitão ersetzt wird.

ABSTRACT

The 19 species of the genus *Pamphobeteus* Pocock are studied and reduced to only 5 good species.

*Agradecimentos* — Agradecemos à Srta. Margarethe Fuerst, os gráficos; à Sra. Thereza Sarli, os desenhos coloridos e ao Snr. J. Talarico, as fotografias.

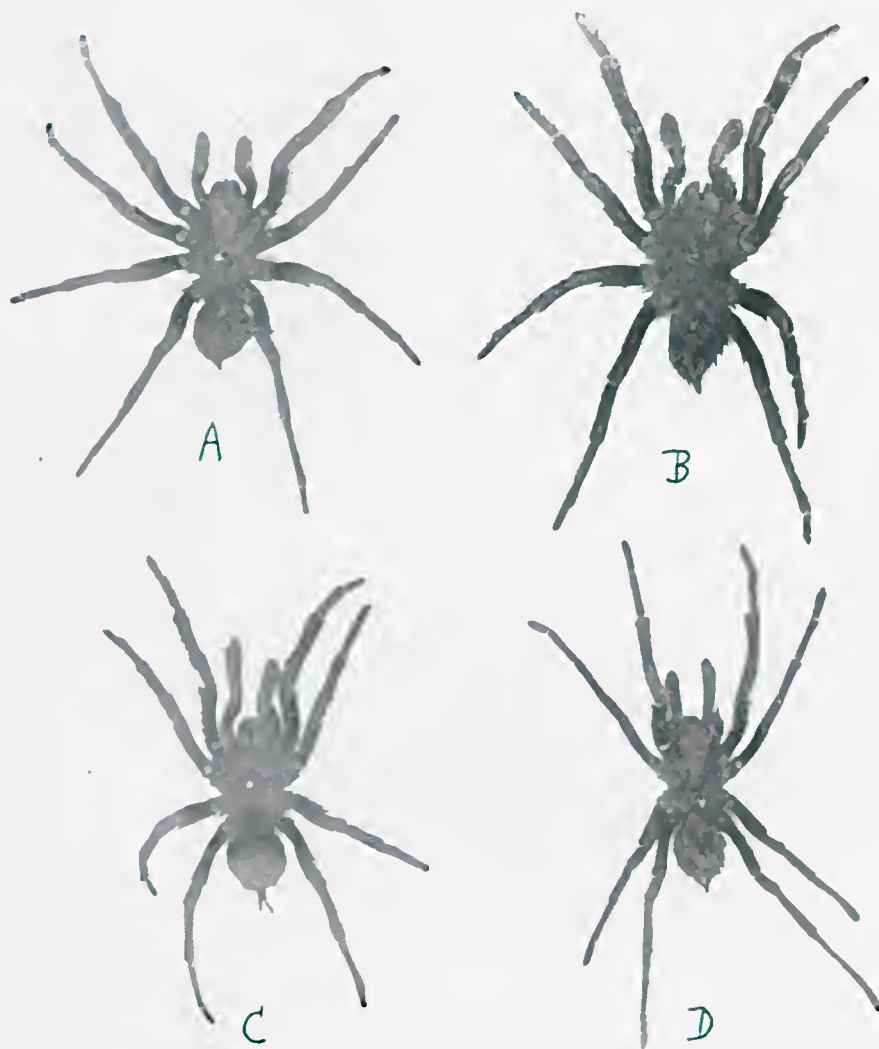
BIBLIOGRAFIA

1. *Ausserer, Verh. zool. bot. Ges. Wien*, **21**:194, 1781.
2. *Bertkau, Verz. d. Brasil. Arachn.*, :34,1880.
3. *Mello-Leitão, C., Rev. Mus. Paulista*, **13**:226, 1923.
4. *Piza S. T. (Jr.), Rev. Agric. Piracicaba*, **8**(3,4):119, 1933.
5. *Piza S. T. (Jr.), Rev. Agric. Piracicaba*, **14**:339, 1939.
6. *Piza, S. T. (Jr.), Rev. Agric. Piracicaba*, **19**:263, 1944.
7. *Soares, B. M., Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, **1**:255, 1941.

*P. sorocabae* ♀

*Pamphobeteus roseus* ♀

*P. rondoniensis* ♀

*P. tetracanthus* ♀

*P. cesteri* ♀

A. *Pamphobeteus roseus* ♂

B. *Pamphobeteus sorocobae* ♂

C. *Pamphobeteus tetracanthus* ♂

D. *Pamphobeteus cesteri* ♂

A. *Pamphobeteus sorocobae* ♀

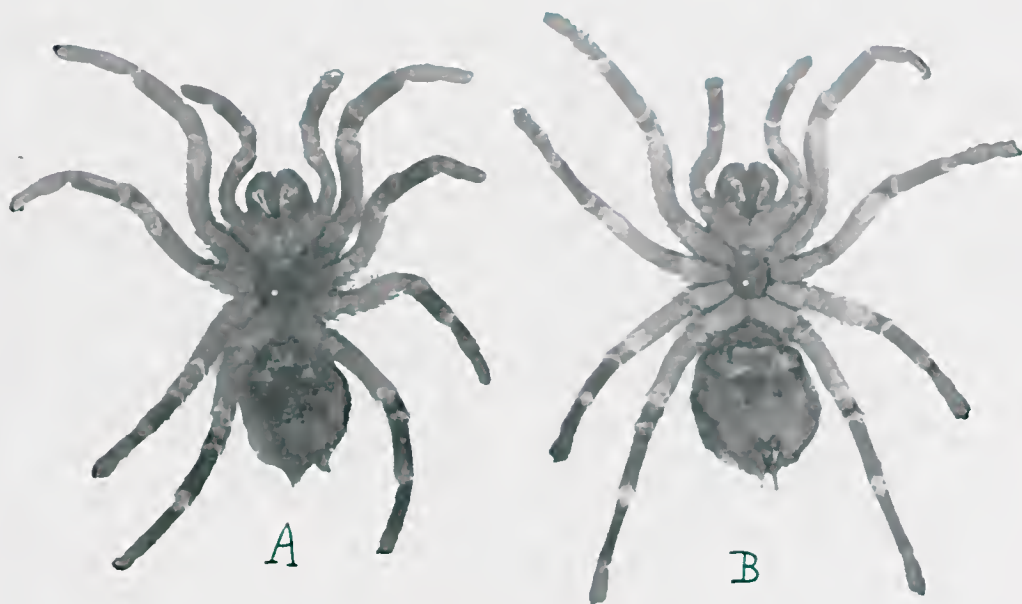
B. *Pamphogeteus roseus* ♀

C. *Pamphobeteus rondoniensis* ♀

A. *Pamphobeteus roseus* ♂

B. *Pamphobeteus sorocobae* ♂

C. *Pamphobeteus tetracanthus* ♂

D. *Pamphobeteus cesteri* ♂

A. *Pamphobeteus tetracanthus* ♀
B. *Pamphobeteus cesteri* ♀

*Pamphobeteus cesteri* ♀

*Pamphobeteus roseus* ♀

*Pamphobeteus rondoniensis* ♀

*Pamphobeteus sorocobae* ♀

*Pamphobeteus tetracanthus* ♀

# NOTAS OFIOLÓGICAS

## 21. *Observações sobre serpentes do Perú*

POR ALCIDES PRADO & ALPHONSE R. HOGE

*(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)*

Estas observações são o resultado do exame de um lote de serpentes que nos foi enviado pelo prof. Carlos Morales Macedo, director do Museu de História Natural Javier Prado, de Lima, Perú.

Desse lote uma parte é agora estudada e relatada, ficando a parte restante para ser divulgada mais tarde, em publicação subsequente.

Da importância de um trabalho desta natureza nada é preciso dizer, porquanto ele se relaciona não só com a sistemática, como também com a distribuição geográfica de um determinado grupo de animais. Disto resulta um maior conhecimento em ambos os sentidos e da descoberta de formas porventura novas à ciência.

Todo o material examinado pertence à coleção do museu acima citado.

### FAM. BOIDAE

### Subfam. Boinae

### Gén. *Epicrates* Wagler, 1830

#### *Epicrates cenchria cenchria* (L., 1758)

No. 31, jovem ♂, procedente de Colonia del Perené, Junin, com data de captura: junho de 1920.

E. 45; V. 266; A. 1; Subc. 59.

Spl. 13 (7a. e 8a. junto ao olho).

---

Recebido para publicação em 1-8-1947.

Loreal muito alongada, em contacto com a 2a. spl. pardo-clara em cima, com aneis pardo-escuros; lateralmente com uma série de ocelos e outra de manchas arredondadas pardo-escuras; cabeça com 5 listras pardo-escuras, longitudinais.

Compr. total 596 mm; cauda 70 mm.

Espécie de larga distribuição na America do Sul, especialmente na parte setentrional.

Gén. *Constrictor* Laurenti, 1768

*Constrictor constrictor ortonii* Cope, 1877

No. 38, adulto ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 65; V. 244; A. 1; Subc. 57

Orbitais 18/19; Spl. 19. Cor muito semelhante à de *Constrictor constrictor imperator* (Daudin), com cerca de 29 faixas transversais sobre o corpo.

Compr. total 565 mm; cauda 60 mm.

Há, como no tipo descrito por Cope, nitida separação entre as orbitais e as supralabiais, por meio de uma fileira de escamas, em cada um dos lados da cabeça.

Gén. *Boa* L., 1758

*Boa hortulana cookii* (Gray, 1842)

No. 37, adulto ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 43; V. 287; A. 1; Subc. 117

Rostral quase tão larga quanto alta; 9 escamas de olho a olho, na fronte, e 10 ao redor; 2 grandes loreais e 2 grandes preoculares; 11 spl. fortemente escavadas, especialmente as que se encontram debaixo e atrás do olho. Parda-escura em cima, com 2 séries alternadas de desenhos romboidais pardo-negros; parte superior da cabeça marmorada de negro; uma listra pardo-negra, de cada lado, atrás do olho; ventre amarelado, manchado de pardo-negro.

Compr. total 800 mm; cauda 148 mm.

É esta forma pela 1.ª vez registada no Perú.

FAM. ANILIDAE

Gên. *Anilius* Oken, 1816

*Anilius scytale* (L., 1758)

No. 8, adulto ♂, procedente de Huánuco, com data de captura: maio de 1946.

E. 21; V. 247; A. 1; Subc. 13

Vermelha, revestida de estreitos aneis negros mais ou menos completos.

Compr. total 606 mm; cauda 20 mm.

Espécie da parte equatorial da América do Sul. Habita os lugares húmidos, vivendo também nas raizes dos velhos troncos.

FAM. COLUBRIDAE

Sbfam. Colubrinae

Gên. *Chironius* Fitzinger, 1826

*Chironius carinatus* (L., 1758)

No. 18, adulto ♂, procedente de Pucallpa, Loreto, com data de captura: fevereiro de 1947.

E. 12; V. 147; A. 1/1; Subc. 119/119

Spl. 9 (4a., 5a. e 6a. junto ao olho): 5 infl. em contacto com a mental anterior. Apresenta-se com 2 séries vertebrais de escamas fortemente carinadas. Cor oliva em cima, com escamas caudais bordadas de negro: cabeça da cor geral; ventre oliva-claro.

Compr. total 1525 mm; cauda 430 mm.

No. 3, adulto ♀, procedente de Satipo, Junin, com data de captura: julho de 1940.

E. 12; V. 153; A. 1/1; Subc. 134/134

Spl. 10/10 (4a. 5a. e 6a. e 5a. e 6a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Escamas dorsais todas lisas. Colorido mais ou menos idêntico ao do exemplar anterior; ventre oliva-escuro.

Compr. total 1160 mm; cauda 400 mm.

## Gén. *Leptophis* Wagler, 1830

### *Leptophis occidentalis nigromarginatus* (Günther, 1866)

No. 20, adulto ♀, procedente de Pucallpa, Loreto, com data de captura: fevereiro de 1947.

E. 15; V. 149; A. 1/1; Subc. 147/147

Spl. 8/9 (4a. e 5a. e 6a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Escamas fracamente carinadas, sendo estas escuras. Verde-azulada em cima, com escamas marginadas de negro; cabeça da cor geral, com placas igualmente marginadas de negro, sendo que as supraoculares e as parietais exibem manchas da mesma cor.

Compr. total 875 mm; cauda 340 mm.

### *Leptophis occidentalis ortonii* Cope, 1876

No. 39, jovem ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 15; V. 158; A. 1/1; Subc. 147/147

Spl. 8 (9 no tipo; 4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Temporais 1+1 (1+2 no tipo), ambas muito grandes, sendo a 2a. mais larga.

Cor azul em cima e azul-clara em baixo (material conservado).

Compr. total 796 mm; cauda 304 mm.

Esta forma é afim da anterior, da qual se distingue especialmente por possuir todas as escamas lisas e as ventrais não angulosas.

## Gén. *Leimadophis* Fitzinger, 1843

### *Leimadophis albiventris* (Jan., 1863)

No. 40, adulto ♂, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: junho de 1918.

E. 17; V. 145; A. 1/1; Subc. 64/64

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); T. 1+2; 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Verde-olivácea em cima; cabeça da mesma cor, com uma barra negra lateral através dos olhos; corpo com uma raia negra lateral, mais visível na porção posterior; ventre branco.

Compr. total 512 mm; cauda 126 mm.

*Leimadophis typhlus* (L., 1758)

No. 14, jovem ♀, procedente de Marcapata, Cuzco, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 19; V. 155; A. 1/1; Subc. 53/53

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Temporais 1+2. Verde-oliva em cima, com pequenas manchas negras disseminadas; ventre branco uniforme.

Compr. total 306 mm; cauda 50 mm.

Gên. *Liophis* Wagler, 1830

*Liophis cobella* (L., 1758)

No. 6, adulto ♂, procedente de Satipo, com data de captura: julho de 1940.

E. 17; V. 155; A. 1/1; Subc. 61/61

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Parda em cima, não se deixando perceber faixas transversais, devido ao mau estado de conservação em que se encontra o exemplar; ventre branco-amarelado, com estrias transversais.

Compr. total 681 mm; cauda 150 mm.

Esta espécie foi, por Beebe, encontrada na Guiana Inglesa e Venezuela, nas touceiras de bambús, alimentando-se de rãs ou de pequenos lagartos.

Gén. *Xenodon* Günther, 1863

*Xenodon severus* (L., 1758)

No. 15, jovem ♀, procedente de Marcapata, Cuzco, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 21; V. 138; A. 1/1; Subc. 40/40

Spl. 8 (4a e 5a. junto ao olho); 6 infl. em contacto com a mental anterior.

Apresenta-se com faixas transversais pardo-negras, separadas por estreitos espaços esbranquiçados; cabeça com uma faixa pardo-negra em forma de U invertido, e outra de olho a olho sobre a fronte; ventre negro, maculado de branco, lateralmente.

Compr. total 230 mm; cauda 23 mm.

Esta forma tem sido registada no Perú, por vários autores.

Gén. *Sibynomorphus* Fitzinger, 1843

*Sibynomorphus catesbyi* (Sentzen, 1796)

No. 1, adulto ♀, procedente de Satipo, com data de captura: julho de 1940.

E. 13; V. 180; A. 1; Subc. 88/88

Ligeiramente parda-avermelhada em cima, com largas manchas arredondadas pardo-escuras, alternadas, sobre o corpo; cabeça negra, com um colar branco nucal: ventre manchado de pardo.

Compr. total 515 mm; cauda 126 mm.

Subfam. Boiginae

Gén. *Rhinobothryum* Wagler, 1830

*Rhinobothryum lentiginosum* (Scopoli, 1785)

No. 9, adulto ♀, procedente de Marcapata, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 19; V. 264; A. 1/1; Subc. 114/114

Spl. 8 (4a. e 5a. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior.

Loreal mais alta do que longa. Temporais 2+2. Escamas carinadas no dorso e lisas lateralmente. Mostra-se com largos aneis pardo-negros, em número de 25, separados de outros mais estreitos, esbranquiçados e pontilhados de pardo-negro; cabeça com placas pardo-negras, tarjadas de branco.

Compr. total 1185 mm; cauda 250 mm.

Serpente rara, porém já registada no Perú.

Gén. *Leptodeira* Fitzinger, 1843

*Leptodeira annulata annulata* (L., 1858)

No. 12. adulto ♀. procedente de Marcapata, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 19; V. 188: A. 1/1; Subc. 101/101

Parda em cima, com uma série dorsal de grandes manchas negras, fusionadas parcialmente, em ziguezague; cabeça parda-escura, com uma faixa pardo-negra, de cada lado da cabeça, do olho à comissura labial.

Compr. total 730 mm; cauda 185 mm.

Foi encontrada no estomago uma *Hyla* sp.

Gén. *Pseudoboa* Schneider, 1801

*Pseudoboa bitorquata* (Günther, 1872)

No. 21, adulto ♀, procedente de Pucallpa, Loreto, com data de captura: fevereiro de 1947.

E. 19; 203; A. 1 ; Subc. 76/76.

Avermelhada em cima, com escamas bordadas de negro; cabeça negra em cima, com duas faixas da mesma cor, nucais; partes inferiores amareladas.

Compr. total 640 mm ; cauda 130 mm.

Forma compreendida na fauna do Perú, por alguns autores já assinalada.

No. 36, adulto ♂, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 19; V. 203; A. 1; Subc. 87/87

Colorido idêntico ao da forma acima.

Compr. total 761 mm; cauda 174 mm.

*Pseudoboa trigemina* (D. & B., 1854)

No. 26, adulto ♂, procedente de Montaña, com data de captura: 1935.

E. 19; V. 195; A. 1; Subc. 83/83

Vermelha, com faixas negras transversais em tríade, bastante regulares.

Compr. total 702 mm; cauda 169 mm.

No. 27, adulto ♀, com a mesma procedência e a mesma data de captura.

E. 19; V. 203; A. 1; Subc. 79/79.

Colorido também igual ao da forma anterior.

Compr. total 977 mm; cauda 189 mm.

Gén. *P h i l o d r y a s* Wagler, 1830

*Philodryas olfersii* (Licht., 1823)

No. 35, adulto ♂, procedente de Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1918.

E. 19; V. 183; A. 1/1; Subc. incompletas

Spl. 8 (4ª. e 5ª. junto ao olho); 5 infl. em contacto com a mental anterior

Uniformemente verde em cima, sem listra negra postocular.

*Philodryas viridissimus* (L., 1758)

No. 22, adulto ♂, procedente de Pucallpa, com data de captura: março de 1947.

E. 19; V. 210; A. 1/1; Subc. 114/114

Spl. 8 (4.ª e 5.ª junto ao olho); infl. em contacto com a mental anterior.

Verde em cima e branca-amarelada em baixo.

Compr. total 760 mm; cauda 210 mm.

Espécie arborícola já mencionada no Perú.

Gén. *O x y b e l i s* Wagler, 1830

*Oxybelis acuminatus* (Wied, 1822)

No. 19, adulto ♀, procedente de Pucallpa, com data de captura: janeiro de 1947.

E. 17; V. 1930; A. 1/1; Subc. 179/179

Spl. 8 (4ª. 5ª. e 6ª. junto ao olho); 3/4 infl. em contacto com a mental anterior.

Uniformemente cinza, manchada de pardo e com leves pontuações negras; cabeça da cor geral, com uma listra negra lateral, através do olho.

Compr. total 1187; cauda 468 mm.

Forma arborícola e muito alongada.

Gén. *E r y t h r o l a m p r u s* Wagler, 1830

*Erythrolamprus aesculapii* (L., 1758)

No. 16, adulto ♀, procedente de Pucallpa, com data de captura: 1947.

E. 15; V. 189; A. 1/1; Subc. 44/44

Spl. 7 (3a. e 4a. junto ao olho): 4/5 infl. em contacto com a mental anterior.

Vermelha, com aneis negros duplos, em séries: cabeça da cor geral, com uma faixa negra na fronte.

Compr. total 760; cauda 95 mm.

No. 29, adulto ♀, procedente de Montaña, com data de captura: 1935.

E. 15; V. 188; A. 1/1; Subc. 45/45

Vermelha, com aneis negros, duplos, agrupados; cabeça e nuca negras, com um colar claro nucal; algumas manchas negras sobre as parietais.

Compr. total 630 mm; cauda 80 mm.

Fam. Elapidae

Subfam. Elapinae

Gén. *Micrurus* Wagler, 1824

*Micrurus spixii obscura* Jan, 1872

No. 13, adulto ♂, procedente de Marcapata, com data de captura: dezembro de 1946.

E. 15; V. 217; A. 1/1; Subc. 5-15/15-2

Vermelha com aneis negros em tríades largas; anel negro sobre o pescoço.

Compr. total 1150 mm; cauda 57 mm.

Em perfeita concordância com Schmidt & Walker, reconhecemos tratar-se da subespécie em questão.

Fam. Crotalidae

Subfam. Lachesinae

Gén. *Bothrops* Wagler, 1824

*Bothrops microphthalmus* Cope, 1876

No. 30, adulto ♀, procedente do Vale de Chanchamayo, com data de captura: 1920.

E. 25; V. 149; A. 1; Subc. 52/52

Pardo-cinza em cima, com manchas pardo-negras triangulares, laterais; ventre pardo-claro na parte anterior e pardo-escuro na posterior.

Compr. total 425 mm; cauda 62 mm.

Cumpre-nos assinalar aqui a presença do poro nasal, facto que se prestou a Maslin para fazer a separação entre *Bothrops* e *Trimeresurus*. No estomago, encontramos restos de um *Teiú* e de uma Perereca.

*Bothrops pictus* (Tschudi, 1849)

No. 33, adulto ♂, procedente de Montaña del Perené, com data de captura: 1920.

E. 23; V. 169; A. 1; Subc. 52/52

Pardo-pálida em cima, com uma série dorsal de manchas pardo-negras, por vêzes confluentes, em ziguezague; pequenas manchas negras laterais; cabeça manchada de pardo-negro no alto; lateralmente, com uma listra pardo-escura atrás do olho, e outra, vertical, abaixo do olho.

Compr. total 370 mm ; cauda 52 mm .

Trata-se de uma pequena forma da fauna peruana.

RESUMO

Relata-se neste trabalho o resultado do exame procedido em parte de um lote de ofídios enviado do Perú. O valor de um estudo desta natureza está em que ele se prende a questões de sistemática e de distribuição geográfica de um importante grupo zoológico.

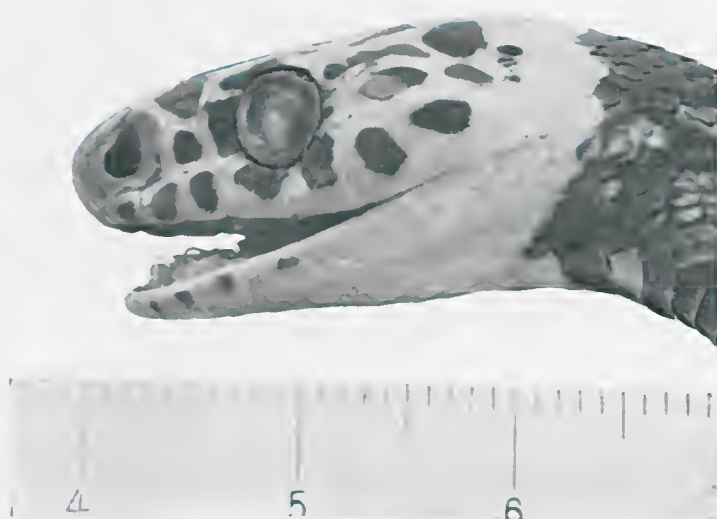
ABSTRACT

This paper deals with the study of a small collection of Peruvian snakes from the Javier Prado Museum of Lima, Perú.

BIBLIOGRAFIA

1. *Beebe, W.* Zool., (1):18, 1942.
2. *Boulenger, G. A.*, Cat. Sn. Brit. Mus., 1-3, 1893-96.
3. *Cope, E. D., J.* Acad. Phil., (2) 8:159, 1876.
4. *Cope, E. D.*, Proc. Ame. Phil. Soc., 17:35, 1877.
5. *Maslin, T. P.*, Copeia, (1) :18, 1942.
6. *Schmidt, K. & Walker, W.*, Zool. Ser. *Field Mus. of Nat Hist.*, 24 (26-27) :279 *et* 297, 143.

Mapa do Perú, com as áreas mencionadas no texto.

*Rhinobothryum lentiginosum* (Scopoli, 1785)

*Rhinobothryum lentiginosum* (Scopoli, 1785)

# DUAS NOVAS ESPECIES DO GENERO *EUPALAESTRUS* POCOCK, 1901.

POR W. BÜCHERL

*(Do Laboratorio de Zoologia Medica do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)*

## INTRODUÇÃO

O genero *Eupalaestrus* Pocock, 1901, pertence à ordem *Araneae*, subordem *Mygalomorphae* (caranguejeiras), familia *Theraphosidae*, subfamilia *Theraphosinae*.

A duas novas especies são, portanto, caranguejeiras, cujos tarsos estão providos de densos tufos subungueais e de duas garras terminais; com quelíceras desprovidas de rastelo; com numerosos espinhos nos metatarsos das pernas posteriores; com abundantes pelos curtos, sedosos, no lado interno dos fêmures do ultimo par de pernas; sem "aparelho estridulante"; com o quarto par de pernas muito mais comprido do que o primeiro e com as tibias e, principalmente, os metatarsos muito espessos em todas as especies conhecidas, normais, entretanto, numa das duas novas especies.

O genero *Eupalaestrus* é, até hoje, representado apenas por tres especies, baseadas unicamente em fêmeas, por tres autores diferentes, ignorando os proprios autores os respectivos machos (Simon, Pocock e Mello-Leitão).

*Eupalaestrus campestratus* foi descrito por Simon, em 1891, assinalando aquele autor o Paraguay como habitat desta caranguejeira.

*Eupalaestrus pugilator* foi descrito em primeira mão por Pocock, em 1901, com habitat na Argentina.

A unica especie conhecida no Brasil é Eupalaestrus spinosissimus, descrito por C. de Mello-Leitão, em 1923, e capturado em Pinheiro, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Pelo grande espaço de tempo decorrido entre as diversas descrições das especies acima e das nossas e pelo pequeno numero de exemplares, pois alem do exemplar tipo dos respetivos autores não são conhecidos outros especimens,

Entregue para publicação em 10 de setembro de 1947.

nem mesmo os respectivos machos, pode-se inferir que se deve tratar de uma caranguejeira muito rara.

Como não se conhecem outras especies no Brasil e como as duas especies novas, que passamos a descrever agora, são muito diferentes entre si e de *spinosissimus* de maneira a excluir qualquer duvida, não hesitamos em proceder à descrição, ainda que tenhamos apenas um exemplar de *Eupalaestrus tarsicrassus,* sp. nov. (uma fêmea). *Eupalaestrus tenuitarsus,* sp. nov., entretanto, está baseada em seis fêmeas e dois machos, sendo os dois machos os primeiros a serem descritos para todo o gênero.

*Eupalaestrus tarsicrassus* sp. nov.

A nossa descrição é forçosamente apenas morfologica, a estabelecer simplesmente o que o presente exemplar tem de particular, sem podermos inferir possiveis variações deste ou daquele carater. Naturalmente sempre está a presente especie nova em confronto com *spinosissimus,* da qual difere fundamentalmente.

Medidas:

| | |
|---|---|
| Comprimento total ................ | 55 mm; |
| Cefalotorax ........................ | 17 por 15 mm; |
| Pernas ............................ | 47 — 42 — 40 — 55 mm; |
| Patela e tibia I ................... | 16.2 mm; IV — 18 mm; |
| Cômoro ocular ..................... | 2.7 por 2.1 mm; |
| Esterno ........................... | 7.2 por 6 mm; |
| Espessura do femur IV — na base ... | 2.5 mm; no apice — 3.5 mm; |
| Espessura da tibia IV — na base ... | 3 mm; no apice — 4 mm; |
| Espessura do metatarso IV — na base | 3.3 mm; no meio — 3.8 mm; no apice — 2,7 mm |

*Colorido* (vide prancha colorida e fotografias):

Cefalotorax cinza escuro, quase preto, com pubescencia olivaceo negra. Quelíceras de pubescencia cinza esbranquiçada, com cerdas escuras na base e avermelhadas nas pontas. Abdomen olivaceo, com cerdas longas, deitadas, vermelhas nas pontas e hastes e olivaceas na base. Pernas, no lado dorsal, cinzentas. Fêmures marron escuro, destacando-se por esta côr das outras articulações. As ultimas pernas inteiramente marrom escuras. Fêmures, patelas e tibias com 2 faixas dorsais, longitudinais, não muito nitidas, cobertas de curtos pêlos cinzentos nos fêmures; "nuas" e um tanto sinuosas e de côr marrom escuro nas patelas; côr de cinza novamente nas tibias (quase imperceptiveis no quarto par

de pernas). Tibias, contiguo às faixas, no lado interno, com 2 listras escuras formando um semi-anel basal (invisiveis no quarto par de pernas). Metatarsos com listra mediana, escura, sinuosa. Tarsos com listra escura, oval, larga. Cordas das pernas anteriores curtas, crescendo em comprimento e intensidade do colorido e aumentando em numero nas ultimas pernas, onde são semi-eretas. Sempre com base escura e haste e pontas avermelhadas, até ao vermelho vivo nas ultimas pernas. Fêmures, patelas, tibias e metatarsos, nos apices, com filas transversais de pêlos curtos, cinzentos, a formar uma especie de anel.

Esterno, labio, ancas dos palpos e coxas das pernas moreno escuros. Ventre igualmente moreno escuro, abrutamente destacado no colorido dos lados do ventre, que são cinza amarelos. Fimbria dos palpos e do labio vermelha. Cerdas ventrais curtas e esparsas, vermelho arroxeadas.

*Olhos*: Olhos médios anteriores duas vezes maiores do que os laterais anteriores, separados entre si e dos laterais menos de meio diametro. Laterais anteriores e posteriores iguais, separados menos de um diametro. Medios posteriores muito pequenos, duas vezes menores do que os laterais posteriores e pelo menos tres vezes menores do que os medios anteriores. Contiguos aos laterais posteriores e bastante afastados dos medios anteriores.

*Esterno*: Pouco mais longo do que largo, com tres pares de sigilas quase ovais e todas equidistantes da margem.

Labio e ancas dos palpos com cuspulas numerosas, irregulares, submarginais.

Queliceras com bainha armada de 11 a 12 dentes enfileirados, que apresentam os seguintes tamanhos: primeiro veem dois dentes menores, depois tres bem maiores, depois novamente tres menores e no fim tres a quatro grandes. No fundo da fileira de dentes, ao lado, existem mais de 15 denticulos, de posição irregular e de tamanho diferente.

Ultimas pernas com tibias e metatarsos muito espessos, a tibia principalmente no lado apical e os metatarsos no lado basal e no meio, sendo a ponta apical novamente de espessura normal.

*Distribuição dos espinhos nas pernas*:

| | *Tibias* | *Metatarsos* |
|---|---|---|
| I | 2 ventro-apicais | O ventro-apicais |
| II | 2 ventro-apicais | 1 ventro-apical mediano |
| | 2 anteriores | |
| III | 2 ventro-apicais | 3 ventro-apicais |
| | 2 anteriores | 2 anteriores |
| | 3 posteriores | 2 ventro-medianos |
| IV | 3 ventro-apicais | |
| | 2 ventro-medianos | muitos e irregularmente distribuidos |
| | 4 anteriores | |
| | 5 posteriores | |

Os quatro prefemures sem espinho algum.

Ancas dos palpos, na face posterior, sem espinhos mas somente com algumas cerdas escuras. Trocanteres do primeiro par de pernas, na face anterior, também sem espinhos, mas somente com pequenas cerdas. Ancas do primeiro par de pernas, na face anterior, acima da sutura, com numerosos espinhos pequenos, irregulares. Os mesmos espinhos escuros, curvos, longos (lembrando cerdas) estão presentes tambem nas ancas, na face anterior, das tres pernas seguintes, aumentando em numero e tamanho no quarto par de pernas. Face posterior das ancas do segundo e do terceiro par de pernas com numerosos espinhos pretos, bem menos numerosos no segundo par.

Confronto morfologico entre

| | *E. spinosissimus* M. L., 1923 e | *E. tarsicrassus* sp. nov. |
|---|---|---|
| Comprim. total ........ | 55 mm | 55 mm |
| Pat. e tibia I .......... | 18 mm | 16 mm |
| Pat. e tibia IV ........ | 20 mm | 18 mm |
| Cefalotorax ........... | 20 mm | 17 mm |

Relação diferencial:

Cefalotorax igual à patela e tibia IV e bem mais longo do que a patela e tibia I (2 cm) — *E. spinosissimus;*

Cefalotorax menor do que a patela e tibiaIV e apenas pouco maior (1,2 cm) do que a patela e tibia I — *E. tarsicrassus* sp. nov.

| | |
|---|---|
| Cefalotorax vermelho escuro com pubescencia pardo chocolate; | C. cinza escuro, quase preto com pubescencia olivaceo negra. |
| Cerdas das queliceras pardas; | Escuras na base, avermelhadas nas pontas. |
| Pernas com linhas longitudinais "nuas"; | Linhas das pernas "nuas" apenas nas patelas e com 2 listras escuras nas tibias e 1 listra sinuosa nos metatarsos. |
| Articulações das pernas sem aneis apicais de pelos; | Todas as articulações, no lado apical, com pelos cinzentos, formando anel. |
| Ventre côr de chocolate; | Murino escuro, com lados amarelos. |
| Rima ocular duas vezes mais larga do que longa; | Apenas muito pouco mais larga do que longa. |
| Olhos m. p. a igual distancia do m. a. e dos l. p.; | M. p. contiguos aos l. p. e afastados dos m. a. mais de dois diametros. |

Numero de espinhos nas tibias e nos metatarsos bastante diferente nas duas espécies.

*Tipo*: Fêmea No. 593 da coleção aracnologica do Instituto Butantan.

*Local-tipo*: São José dos Campos, Estado de São Paulo, Brasil.

*Data de captura*: 6-8-47.

*Eupalaestrus tenuitarsus*, sp. nov.

Dimensões:

| No. | Sexo | Compr. total | Cefalot. | Pat. e tib. I | IV |
|---|---|---|---|---|---|
| 86 | fêmea | 47 mm | 21 mm | 19 mm | 20,5 mm |
| 90 | fêmea | 37 mm | 17 mm | 15 mm | 16,4 mm |
| 91 | fêmea | 50 mm | 22 mm | 19 mm | 20,4 mm |
| 110 | fêmea | 55 mm | 22 mm | 18,6 mm | 20,3 mm |
| 502 | macho | 37 mm | 16 mm | 18,2 mm | 20,4 mm |
| 607 | macho | 38 mm | 16,2 mm | 18,2 mm | 20,8 mm |
| 612 | fêmea | 55 mm | 21,6 mm | 17,6 mm | 19,7 mm |
| 653 | fêmea | 46 mm | 21 mm | 17,5 mm | 19,0 mm |

*Colorido:* (vide prancha colorida e fotografias):

Cefalotorax com densa pubescencia cinza escura. Orla do cefalotorax e dos pelinhos das queliceras cinza claro. Abdomen com densa pubescencia sedosa, olivacea, e com longos pelos vermelhos, semi-eretos, dirigidos para traz, ocupando toda a parte superior e ambos os lados do abdomen. Esterno, coxas, trocanteres e femures com pubescencia cinza e com longos pelos avermelhados nas pontas e com haste preta. O numero destes pelos é maior nas ultimas pernas, principalmente nos trocanteres e femures, onde chegam a atingir o comprimento de 1 cm. Ventre e lado ventral das fiandeiras pretos, como tambem o lado ventral da patela, tibia, do metatarso e tarso do quarto par de pernas. Labio e ancas dos palpos vermelhos. Cuspulas do labio numerosas; as dos palpos maiores e menos numerosas. Fimbria dos labios e das ancas dos palpos vermelho tijolo.

Lado dorsal das pernas com pubescencia cinza clara, menos nos femures que apresentam tonalidades de um cinza olivaceo. Pernas com desenhos ornamentais, que consistem em duas faixas e em listras e que se apresentam tão nitidas como se vê raras vezes em qualquer outra caranguejeira.

As duas faixas são cinza claro e as listras escuras, quase pretas. Fêmures com duas faixas, longitudinais, paralelas, muito delicadas; patelas com as duas faixas bem mais largas, às vezes tripartidas, convergindo apicalmente a formar quasi uma ponta. Tibias novamente com faixas paralelas. Metatarsos apenas com uma faixa cinzenta, mediana, na metade basal, mais fraca nos metatarsos das ultimas pernas. Tibias no lado interno das faixas e contiguo a estas, duas listras pretas, estreitas, longitudinais, a começar na base desta articulação com um semi-anel basal e a terminar um pouco adiante da metade da articulação.

Metatarsos com listra preta, sinuosa, a percorrer em forma de "S" a articulação toda. Tarsos com listra preta, oval, tendo no meio uma faixa marrom nitida.

Cefalotorax muito mais longo do que a patela e tibia do primeiro par de pernas e ainda mais longo do que a patela e tibia do quarto par de pernas. Patela e tibia IVª. mais longa do que a Iª.

Rima ocular quase circular, isto é, apenas muito pouco mais larga do que longa nas fêmeas; nos machos é quase inteiramente circular.

Os quatro olhos anteriores iguais em tamanho, sendo, entretanto, os medios absolutamente redondos e os laterais ovais; separados entre si um pouco menos de um diametro. Equidistantes. Médios posteriores um pouco menores do que os laterais posteriores e contiguos a estes; separados dos medios anteriores mais de um diametro. Os olhos dos outros exemplares conferidos variam um pouco em distancia e tamanho, mas obedecem, contudo, sempre ao esquema acima, como tambem os olhos dos machos. Fovea toracica direita nas fêmeas, levemente procurva nos machos.

Sigilas do esterno separadas da margem mais de dois diametros, quase invisiveis, por serem inteiramente encobertos pela pubescencia do esterno. Pernas com escopulas, distribuidas da seguinte maneira:

Nas femeas os metatarsos são escopulados até a base no primerio e no segundo par de pernas, havendo logo abaixo das escopulas pelos longos, amarelos, que formam um anel basal no lado ventral.

Metatarsos do terceiro par de pernas escopulados nos dois terços apicais e no quarto par de pernas ha escopulas apenas no ultimo quarto apical. Nos machos existem escopulas no primeiro par de pernas apenas na metade apical; no segundo par apenas numa area pouco maior do que o terço apical; no terceiro par as escopulas apenas ocupam um quinto apical e no ultimo par de pernas já não mais existem escopulas, sendo toda a area ventral ocupada por cerdas e numerosos espinhos.

Pernas posteriores pelo menos 6 cm. mais compridos do que as anteriores, sendo a relação do comprimento a seguinte:

Ultimo par; primeiro par; segundo e, finalmente, o terceiro par. Esta ordem prevalece igualmente nos machos.

Espessura das articulações das ultimas pernas (no lado dorsal):

Femures — 4,5 a 5 mm no lado basal — 4,5 a 5 mm no lado apical;
Patelas — 3,9 a 4,5 mm no lado basal — 3,9 a 4,5 mm no lado apical;
Tibias — 3,9 a 5 mm no lado basal — 3,9 a 5,0 mm no lado apical a 4,5 a 6mm no meio da articulação.

Metatarsos — 2.5 mm no lado basal e 2 mm no lado apical. Os metatarsos são, portanto, absolutamente normais, isto é, são iguais aos dos outros generos, em oposição ao *Eupalaestrus tarsicrassus*, sp. nov. e às demais especies deste genero, em que justamente os metatarsos são muito mais espessos, do que as tibias. Tarsos completamente normais nas medidas.

*Machos:*

Femures — 3.8 mm no lado basal — 3.8 mm no lado apical;
Patelas — 3.5 mm no lado basal — 3.0 mm no lado apical;
Tibias — 4.1 mm no lado basal — 4.0 no meio — 4.1 mm no lado apical.

Metatarsos novamente normais, como nas femeas.

As patelas, tibias e os metatarsos, tanto dos machos como das femeas, de todas as pernas ostentam pelos hirsutos, abundantissimos, principalmente nas ultimas pernas. Entretanto, não existem nesta especie nova os pequenos espinhos negros de *spinossimus*.

*Numero de espinhos nas pernas:*

| | *Femeas* | *Machos* |
|---|---|---|
| Metatarso I — | 2 a 3 ventro-apicais | 3 ventro-apicais |
| | | 2 anteriores |
| | | 3 posteriores |
| Metatarso II — | 2 a 3 ventro-apicais | 4 ventro-apicais |
| | 0 a 1 ventral | 2 a 3 anteriores |
| | | 2 a 3 posteriores |
| Metatarso III — | 4 a 5 ventro-apicais | 4 ventro-apicais |
| | 1 a 3 anteriores | 3 a 4 anteriores |
| | 1 a 3 posteriores | 3 a 4 posteriores |
| Metatarso IV — | 15 a 26 espinhos ao todo — | 22 a 25 espinhos ao todo |
| Tibia I — | 1 ventro-apical | 1 ventro-apical e 6 no resto |
| Tibia II — | 1 ventro-apical | 2 ventro-apicais e 4 no resto |
| Tibia III — | 2 ventro-apicais | 4 ventro-apicais |
| | 3 a 5 anteriores | 2 a 3 anteriores |
| | 1 a 3 posteriores | 2 a 3 posteriores |
| Tibia IV — | 2 ventro-apicais | 3 ventro-apicais |
| | 1 a 2 anteriores | 2 anteriores |
| | 0 a 1 posterior | 2 posteriores. |

Fileira de dentes nas queliceras dos machos constituida de 12 a 13 dentes enfileirados, sendo os tres primeiros os maiores, seguindo-se então, 4 a 5 dentes menores e novamente 5 a 6 maiores. No lado interno dos dois ultimos existem

alguns denticulos muito pequenos, incolores, bem menores do que os de *tarsicrassus*, sp. nov.

Nas femeas de *tenuitarsus*, sp. nov., os dentes das queliceras são em numero de 9 a 11, geralmente, porém, de 10, equidistantes e do mesmo tamanho, tendo no fundo, na area dos tres ultimos dentes, 13 a 17 denticulos, pequenos, maiores, entretanto, do que os dos machos.

Ancas, na face anterior, acima da sutura, dos quatro pares de pernas, nas femeas, com espinhos curvos numerosos nas ancas posteriores. Trocanteres dos primeiros dois pares de pernas, igualmente na face anterior, com alguns espinhos, mais longos e curvos do que os das ancas. Face posterior das ancas dos palpos e dos primeiros tres pares de pernas com pequenos espinhos curtos e ponteagudos, muito poucos em numero nos palpos, aumentando seu numero gradativamente nas pernas seguintes até atingir o maior numero no terceiro par. Ultimas pernas sem estes espinhos.

Primeiro par de pernas do machos com apofise tibial (vide prancha colorida) dupla, recurva em forma de anel, sendo a inferior duas ezes maior do que a interna. Flexionamento dos metatarsos no lado esterno da inferior (maior). Orgão copulador com um corpo quase redondo e bem volumoso e com apofise retorcida apenas em meia volta e relativamente curta (vide prancha).

*Tipo*: Femea sob N°. 612 da coleção do Instituto Butantan.

*Local-tipo*: Tounay, Estado do Mato Grosso, Brasil.

*Remetente*: Julio de Oliveira.

*Paratipos*: 5 femeas, procedentes do mesmo local: Nos. 86, 90, 91, 110, 653: 2 machos, do mesmo local: Nos. 502 e 607, todos na coleção aracnologica do Instituto Butantan.

Procedendo a um confronto morfologico, dentro dos limites do numero restrito de exemplares das tres especies brasileiras, pode-se etabelecer a seguinte chave sinetica:

*Femeas*:

a) Cefalotorax igual à patela mais a tibia IV e maior do que a patela mais a tibia I — *E. spinosissimus*, M.L. (Estado do Rio de Janeiro).

b) Cefalotorax menor do que a patela e tibia IV e apenas pouco maior do que a patela mais a tibia I — *E. tarsicrassus*, sp. nov. (Estado de São Paulo).

c) Cefalotorax bem maior do que a patela mais a tibia IV e muito maior do que a patela e tibia I—*E. tenuitarsus*, sp. ov. (Mato Grosso).—

Alem destes caracteres que, como já acentuamos num trabalho morfologico comparativo sobre as especies brasileiras do genero *Pamphobeteus*, são absolutamente seguros e invariaveis, ha a assinalar, como segundo caracter diferencial

entre as tres especies: — o colorido diferente, igualmente de grande valor sistematico:

a) Ancas das pernas e ventre côr de chocolate; cefalotorax pardo-chocolate; abdomen castanho esverdeado — *E. spinosissimus.*

b) Ancas das pernas, esterno e ventre murino escuros; cefalotorax olivaceo negro-*E. tarsicrassus,* sp. nov.

c) Ancas das pernas e esterno cinza; ventre preto; cefalotorax cinza escuro; abdomen olivaceo-*E. tenuuitarsus,* sp. nov.

Em *Eupalaestrus tenuuitarsus,* sp. nova, ha igualmente um dimorfismo sexual nas medidas de comprimento do cefalotorax em relação aos comprimentos das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas e que é o seguinte:

*Machos*: Cefalotorax sempre menor do que a patela e a tibia I e muito menor ainda do que a patela e tibia IV.

*Femeas*: Cefalotorax muito mais longo do que a patela mais a tibia I e maior ainda do que a patela mais a tibia IV.

Quanto à relação de comprimento entre as patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas tanto os machos como as femeas apresentam novamente intimo parentesco, isto é, em ambos os sexos as patelas e as tibias do quarto par de pernas sempre são maiores do que as do primeiro par, de maneira que não é possivel confundir os machos desta especie com os que, no futuro, serão descobertos como pertencentes às outras duas especies.

## RESUMO

No presente trabalho são descritas duas especies novas do genero *Eupalaestrus* Pocock, a saber: *Eupalaestrus tarsicrassus,* sp. nov. e *E. tenuuitarsus,* sp. nov., que se distinguem entre si e da terceira especie brasileira, *E. spinosissimus* M.L.,:

1°. Pelo colorido diferente de cada especie;

2°. Pela relação das medidas de comprimento do cefalotorax e das patelas mais tibias do primeiro e do quarto par de pernas e que são as seguintes:

a) Cefalotorax igual à patela mais tibia IV-*E. spinosissimus* M.L.

b) Cefalotorax menor do que a patela e tibia IV-*E. tarsicrassus,* sp. nova.

c) Cefalotorax maior do que a patela mais a tibia IV-*E. tenuuitarsus,* sp. nova.

3°. Por um habitat diferente:

*spinosissimus* provêm de Pinheiro, Estado do Rio de Janeiro;

*tarsicrassus* de São José dos Campos, Estado de São Paulo;

*tenuitarsus* de Tounay, Estado do Mato Grosso.

As duas novas especies se distinguem entre si igualmente pelo colorido, caracteristico para cada uma e inconfundivel; pelas medidas de comprimentos do cefalotorax e das patelas e tibias I e IV e ainda porque, em *tarsicrassus*, sp. nov., os ultimos metatarsos são espessados, bastando conferir as medidas correspondentes, enquanto que em *tenuitarsus*, sp. nov., os ultimos metatarsos são de espessura normal, sendo os ultimos femures, as patelas e principalmente as tibias muito espessados.

Tendo em consideração justamente estes caracteristicos diferenciais, démos às duas especies novas os seus nomes caracteristicos, que procuram expressar esta diferença.

Finalmente é descrito ainda o macho de *E. tenuitarsus*, sp. nov., sendo esta descrição tanto mais interessante, quanto vem a preencher uma grande lacuna, pois até agora não se conheciam os machos de nenhuma especie deste genero.

ABSTRACT

*Eupalaestrus tarsicrassus* and *E. tenuitarsus* are described as new species of the genus *Eupalaestrus* Pocock. The new species can be easily distingued for herselves and for the third species of this genus, *E. spinosissimus* Mello-Leitão, 1923, as follow:

a) All three have a different habitat. *Spinosissimus* is from Pinheiro, Estado do Rio de Janeiro; *tarsicrassus*, sp. nov., is from São José dos Campos, Estado de São Paulo and *tenuitarsus*, sp. nov., is from Tounay, Estado de Mato Grosso, Brasil.

b) The three species have a proper specific color, expresseed chiefly on the cephalotorax, on the ventral side of abdomen, sternum and coxae.

c) The three species have a characteristic and strictly specific relation between the length of cephalotorax and patellae and tibiae IV:

1. Cephalotorax as long as the patellae and tibiae IV-*spinosissimus*;

2. Cephalothorax longer than the patellae and tibiae IV-*tenuitarsus*, sp. nov.;

3. Patellae and tibiae IV longer than the cephalotorax—*tarsicrassus*, sp. nov. In this paper also is described the first male of the Brazilian species of this genus.

ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender systhematischer Arbeit werden zwei neue Arten der Gattung *Eupalaestrus* Pocock beschrieben:..*E. tarsicrassus, sp. nov.*, aus São José dos Campos, Estado de São Paulo und *E. tenuitarsus*, sp. nov., aus Tounay, Estado de Mato Grosso, Brasilien. Die beiden neuen Arten unterscheiden sich voneinander und von der, von Mello Leitão, in Jahre 1923, beschriebenen Art. E. *spinosissimus*, aus Rio de Janeiro, wie folgt:

a) Durch die verschiedene, charakteristische Faerbung, hauptsaechlich des Cephalothoraxes, des Sternums, der Beinhueften und der ventralen Bauchseite;

b) Durch ein verschiedenes habitat;

c) Durch eine jeweils verschiedene, durchaus charakteristische und arteigene Beziehung der Laengenmasse des Cephalothoraxes in Beziehung mit den Laengenmassen der Patellen und Tibien des ersten und des vierten Beinpaares und die folgendermassen in einem Artenschluessel ausgedrueckt werden koennen:

1. Cepht. gleich lang wie die Patellen und Tibien IV-*spinosissimus*

3. Cepht. laenger als die Patellen und Tibien IV-*tenuitarsus*, sp. nov..

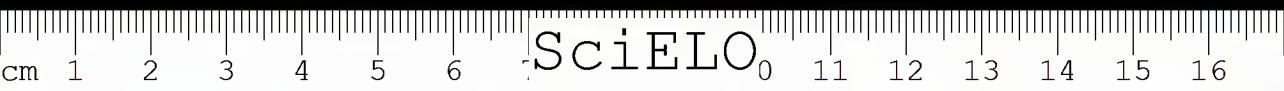
2. Cept. kuerzer als die Patellen und Tibien IV-*tarsicrassus*, sp. nov..

Ausserdem unterscheiden sich die beiden neuen Arten durch die morphologische Beschaffenheit des letzten Beinpaares. Bei *tarsicrassus* sind *hauptsaechlich* die letzten Metatarsen sehr verdickt, waehrend bei *tenuitarsus* die Femures, Patellen und Tibien verdickt sind und die Metatarsen wieder normale Dicke aufweisen.

Schliesslich wird in dieser Arbeit auch das erste Maennchen der ganzen Gattung bescrieben.

À Dona Theresa Sarli e ao Snr. J. Talarico, da Secção de Fotografia, do Instituto Butantan, os nossos agradecimentos pelos desenhos coloridos e pelas fotografias.

BIBLIOGRAFIA

1. *Simon, E., Ann. Soc. Entom. Belgique*, 60:311, 1891.
2. *Pocock, Ann. Mag. Nat. Hist. ser. 7*, 8:546, 1901.
3. *Mello Leitão, C. de Rev. Mus. Paulista*, 13: 221, 1923.

*Eupalaestrus tarsicrassus* ♀

1. *Eupalaestrus tenuitarsus sp. nova* ♀
2. *Eupalaestrus tenuitarsus* ♂ — *apófise da tibia*
3. *Eupalaestrus tenuitarsus* ♂ — *orgão copulador*

*Eupalaestrus tenuitarsus* ♀

*Eupalaestrus tenuitarsus* ♀

*Eupalaestrus tenuitarsus* ♂

*Eupalaestrus tenuitarsus* ♂

*Eupalaestrus tarsicrassus* ♀

*Eupalaestrus tarsicrassus* ♀

# METODO RAPIDO DE COLORAÇÃO DE ESFREGAÇOS DE SANGUE. NOÇÕES PRATICAS SOBRE CORANTES PANCROMICOS E ESTUDO DE DIVERSOS FATORES.

POR G. ROSENFELD

*(Do Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

A coloração de esfregaços pelos metodos pancromicos apresenta quase sempre variações nas mãos do mesmo tecnico, e especialmente quando executados por pessôas com pouca experiencia nessas colorações. No entanto trata-se de um trabalho elementar e simples em que não devem existir esses inconvenientes, que provavelmente são acentuados pela falta de exatidão das tecnicas como são usualmente descritas.

É frequente ver-se recomendado o uso de quantidades medidas em gotas, estas variam bastante de volume com os conta-gotas ou as pipetas com que são contadas, acarretando sempre variações na relação entre agua e corante, o que é importante na coloração.

Em algumas tecnicas aconselham o uso de numero igual de gotas de corante e de agua, outros interpretando esses dados erroneamente recomendam quantidades iguais medidas em cm3. Ora é muito grande a diferença entre os dois metodos, os corantes sendo usualmente dissolvidos em metanol dão gotas com cerca da metade do volume das de agua, de modo que enquanto no primeiro metodo a quantidade de agua é cerca do dobro da de corante, no segundo elas são realmente iguais. Isso sem contar a variação do volume das gotas condicionadas pelas circunstancias anteriormente mencionadas.

No presente trabalho estudamos os diversos fatores que têm influencia na coloração, assim como metodos de conservação das preparações coradas, com o intuito de fixar todos os dados para uma tecnica de coloração rapida e simples, o mais regular e independente possivel do fator pessoal, afim de eliminar o fator virtuosidade até agora importante nessas colorações. O resultado foi um metodo de coloração simples e muito proximo dos metodos usuais de coloração rapida em que, porém, estão determinados os fatores de variação e sua influencia. Os dados obtidos serviram-nos de base para a preparação de um corante que propuzemos em outro trabalho (3), porém o metodo de coloração pode ser aplicado á maioria dos corantes usuais.

Recebido para publicação em 27 de outubro de 1947.

## MATERIAL E METODOS

Os esfregaços de sangue eram feitos de modo usual em laminas e datando no maximo 24 horas, pois, que, quanto mais velhos dão colorações um pouco peores e portanto não bem comparaveis.

*Corantes* — Usamos diversos: Leishman, Wright, Giemsa e o corante por nós proposto (3). De fabricação "Grübler" e "Harleco" os 3 primeiros e "Corm" os quatro.

As soluções de corantes que devem sempre ser conservadas em vidros secos e bem fechados foram preparadas das seguintes maneiras:

*Soluções metilicas* — 0. 15 gr. % de corante em metanol sintetico, neutro ao tornesol. Essa solução é agitada algumas vezes, conservada á temperatura ambiente e, no dia seguinte filtrada, depois do que está pronta para usar. Foram tambem preparadas, diluindo 1 parte de solução glicerinada com 4 partes de metanol, porém não com resultados tão bons quanto com a solução metilica pura.

*Soluções glicerinadas tipo Giemsa* — 0.75 gr. % de corante numa mistura de partes iguais de metanol e glicerina pura com d-1,26. Essa solução é agitada diversas vezes e conservada 2 a 6 horas a 60°, ou cerca de 12 horas a 37°. No dia seguinte é filtrada e está pronta para usar.

*Solução tampão* — Foi preparada com fosfato monopotassico anidro ($K\ H_2\ P\ O_4$), e fosfato disodico anidro ($Na_2\ H\ P\ O_4$). Foram feitas soluções a 10% com cada um desses sais. A mistura correspondente ao p 6,95 e a uma concentração M/1,5 foi preparada adicionando 54,468 ml. da solução de fosfato monopotassico a 107,0 ml. da solução de fosfato disodico. Essa solução stock com uma concentração de 10,7645 gr % para ser usada era diluida a 10% em agua distilada.

O pH foi sempre determinado com potenciometro.

*Secagem* — A secagem das laminas depois de coradas e lavadas, era feita com um dessecador de ar quente, do modelo corrente para secagem de cabelo, instalado sob a mesa com a boca voltada para cima e adaptada a um orificio do mesmo diametro feito no tampo da mesa. Esse metodo de secagem economiza muito tempo e quando o volume do trabalho de rotina justifica essa despeza é o mais aconselhavel. Tem as vantagens de ser rapido, evita arranhar o esfregaço e o tempo exigido para secar é suficientemente curto para evitar que a lamina descore irregularmente como acontece quando se deixa a lamina em posição vertical para escorrer e secar.

## RESULTADOS

### *Coloração*

1) *Coloração na fase de fixação* — Essa verificação foi feita, cobrindo no microscopio esfregaços não fixados com corante em solução metilica, que eram imediatamente recobertos com laminula. Após alguns segundos notava-se que os nucleos ficavam corados em azul violaceo, sem grande intensidade porém com notavel delicadeza de estrutura. Depois coravam-se as hemacias em rosa palido, as plaquetas com o cromomero em violaceo, e, finalmente, as granulações e o citoplasma dos leucocitos. Essa coloração atingia o maximo no fim de 1 minuto ou pouco mais.

2) *Diluição do corante sobre o esfregaço* — Dois lotes de laminas foram tratados das seguintes maneiras:

a) Os esfregaços foram fixados com metanol durante 1 minuto, depois de secados foram corados durante 10 minutos com uma diluição feita no momento num provete, de 1 ml de corante com 2 ml de agua distilada.

b) Os esfregaços foram fixados cobrindo com 1 ml de corante, depois de 1 minuto juntou-se 2 ml de agua distilada e depois de misturado deixou-se corar durante 10 minutos.

As laminas do lote *B* mostravam nucleos com estrutura mais delicada e detalhes citoplasmaticos mais nitidos.

3) *Volume do corante* — Foram experimentadas diversas quantidades de corante, desde 0.1 até 2.0 ml. A quantidade que recobria bem os esfregaços, era suficientemente para uma boa fixação e cuja evaporação dentro do tempo de fixação escolhido não foi prejudicial à coloração, foi de 0.5 ml.

4) *Tempo de fixação* — Foram fixadas preparações pelo metanol, com tempos que variavam de 1 minuto, desde 1 até 10 minutos. Essas laminas foram depois coradas de igual modo com uma mesma solução aquosa de corante. Foi verificado que estavam todas bem fixadas e coradas igualmente, portanto o tempo de 1 minuto é o melhor, pois o mais curto dos tempos suficientes é o que permite menor evaporação com as variações das condições do ambiente, como a temperatura e ventilação.

Usando esfregaços muito recentes, de alguns minutos apenas, a fixação de 1 minuto falhava ás vezes, porém era perfeitamente suficiente si prolongada para 1 1/2 a 2 minutos. Tambem foi possivel corrigir essa falha secando muito bem o esfregaço antes de fixa-lo, agitando muito bem e vigorosamente a lamina ou melhor ainda, submetendo durante alguns minutos á corrente de ar do dessecador.

5) *Segunda fase ou tempo de coloração* — O tempo de coloração dependia principalmente da concentração do corante já que o volume estava determinado.

Em virtude disso achamos preferivel escolher a priori um tempo mais comodo que economizasse tempo e não fosse excessivamente curto, de modo que variações moderadas não acarretassem modificações sensiveis da coloração. Esse tempo foi arbitrado em 5 minutos e depois experimentamos diferentes concentrações até achar a melhor.

6) *Volume da agua* — Foram coradas laminas com diferentes volumes de agua, desde 0,5 ml até 2,5ml, com variações de 0,5 ml. Foi observado que 1 ml de agua com 0,5 ml de corante resulta numa quantidade de solução corante que recobre bem a lamina e permite misturar perfeitamente sem transbordar o liquido.

7) *Relação entre volume de corante e agua* — Depois de experimentadas diversas proporções entre corante e agua, a relação de 1:2 foi a que deu coloração mais eficiente dentro do tempo de 5 minutos. Havia uma precipitação de corante muito pequena, evitando-se assim o risco de inutilizar
pelo deposito de precipitado de corante, o que se dava quando se aumentava a proporção de agua. Diminuindo-a a coloração era pouco intensa devido à precipitação e dissolução insuficientes das substancias corantes na agua.

8) *Condições da agua distilada* — A agua distilada recente dá muito boas colorações e tem um pH muito proximo da neutralidade. Quando a agua não é recente, em geral com mais de 1 semana e especialmente si ficou exposta ao ar, já não dá boas colorações e o seu pH baixa. Porém essa mesma agua ou mesmo mais velha, submetida á ebulição durante 10 minutos torna a um pH
mente neutro e dá boas colorações.

Portanto é o contato com o ar que inutiliza a agua para a coloração tornando-a acida. Isso é devido ao $CO_2$, esta verificação foi feita borbulhando ar por meio de vacuo, em agua distilada e em solução diluida de hidrato de bario. Com 15 minutos de passagem de ar já havia precipitação de carbonato de bario. Esse mecanismo pode ser verificado nas tabelas 1 e 2, onde está demonstrado como o borbulhamento de ar ou de $CO_2$ acidificam a agua.

TABELA I

| | Tempo minutos | $H_2O$ | | Sol. Tampão 1 % | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | pH | coloração | pH | coloração |
| Antes .................. | — | 6,95 | boa | 7,05 | boa |
| Depois de borbulhar o ar . | 90' | 6,6 | sofrivel | 7,0 | regular |
| Depois de ferver ........ | 5' | 6,9 | regular | 7,1 | boa |
| Depois de ferver ........ | 10' | 7,0 | boa | 7,15 | boa |

Essa acidez devida ao $CO_2$ é eliminada pela abulição dentro de 10 minutos, isso tambem está demonstrado na mesma tabela. Tambem foi verificado pela ebulição de agua distilada velha ou borbulhada com ar, em que o vapor expelido do balão passava noutro com uma solução de hidrato de bario. Nos primeiros minutos já aparecia um precipitado de carbonato de bario, no fim de 10 minutos foi substituido o balão com bario por outro com solução nova, este segundo balão não mostrou nenhuma passagem de $CO_2$ nos 10 minutos subsequentes de fervura a que continuamos a submeter a agua.

O mais pratico é portanto utilizar agua distilada recente e no fim de uma semana substitui-la por outra. Desde que se submeta a agua á ebulição durante 10 minutos antes de po-la em uso, o que é o mais recomendavel, não é necessario usar agua recentemente distilada.

9) *Concentração de sais na solução tampão* — Utilizamos uma mistura de fosfato monopotassico e de fosfato disodico com pH 6,95. Na concentração M/1.5 ou seja 10.76 gr % de sal, a solução tampão demonstrou uma ação impediente sobre a coloração. Numa concentração 10 vezes menor, esse efeito não se faz notar a não ser em grau muito ligeiro. A solução stock diluida á 1% em agua distilada, com a concentração de 0.1076 gr. % deu bons resultados.

O envelhecimento estraga a solução tampão diluida, do mesmo modo que a agua distilada, porém não tão rapidamente. Esses sais não tem ação tampão contra o $CO_2$, ou é muito pequena como em geral para todos os acidos organicos fracos. O mecanismo da alteração da solução tampão é o mesmo que o da agua distilada como pode ser observado pelos dados das tabelas 1 e 2.

TABELA II

| | Tempo minutos | $H_2O$ | | Sol. Tampão 1 % | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | pH | coloração | pH | coloração |
| Antes .................. | — | 6,95 | boa | 7,05 | boa |
| Depois de borbulhar $CO_2$ . | 5' | 4,2 | má | 5,5 | má |
| Depois de ferver ........ | 5' | 6,3 | má | 7,0 | regular |
| Depois de ferver ........ | 10' | 6,95 | regular | 7,05 | boa |

10) *pH* — Usamos soluções tampão com diversos pH, desde 6,0 até 8,0. As melhores colorações para fins usuais de hematologia e citologia clinica foram obtidas com soluções neutras ou quase neutras. Soluções mais alcalinas com pH 7,2 ou 7,4 são mais indicadas para o estudo de parasitas; soluções acidas com pH 6,4 ou menos, para o estudo de granulações e modificações citoplasmaticas.

11) *Lavagem* — Coramos laminas com a mesma agua e algumas foram lavadas com agua distilada já velha e acida, outras com agua corrente alcalina, e finalmente outras com a mesma agua que tinha servido para a coloração e que tinha pH 6,95. O primeiro grupo apresentava uma coloração muito avermelhada, o segundo muito azulada e o terceiro estava bem corado.

Frequentemente as laminas são coradas com agua distilada ou solução tampão com todos os requisitos exigiveis, e depois são lavadas ou com agua distilada velha geralmente acida, ou com agua corrente em geral alcalina (num laboratorio na nossa cidade, chega a atingir pH 8,8). No primeiro caso a coloração torna-se avermelhada e muito descorada e no segundo, azulada e menos diferenciada. Isso se dá porque a coloração é facil e rapidamente influenciada pelas variações do pH. Devido a esse fato é logico que deve ser usada para a lavagem a mesma agua ou solução tampão empregada para a coloração.

Durante a lavagem faz-se a diferenciação da coloração, e quanto mais tempo a lamina permanecer molhada, maior será, podendo ficar muito descorada si fôr excessivamente demorada.

## *Conservação*

É sabido que as colorações pancromicas são as mais dificeis de ser conservadas, pois têm tendencia a se descorar e são muito influenciadas por emanações acidas de qualquer natureza. Foram experimentados varios metodos depois de retirar todo o oleo de cedro com xilol.

1) *Balsamo do Canadá* — Fechando a preparação com balsamo do Canadá e laminula, mesmo que seja da melhor proveniencia e esteja em boas condições, a coloração é prejudicada e destruida em prazo relativamente curto pela oxidação e consequente acidificação da resina.

2) *Oleo de cedro* — Tem os mesmos inconvenientes do balsamo, apenas as alterações se dão num prazo um pouco mais longo.

3) *Parafina liquida* — Cobre-se simplesmente o esfregaço com uma ligeira camada espalhada com o dedo. Com o tempo a lamina fica praticamente seca e ha tendencia a aglomerar detritos que ficam aderentes ao esfregaço. Ao ser retirada a parafina com xilol os detritos continuam aderentes ou arranham a superficie da preparação ao se tentar retira-los.

4) *Parafina solida* — Funde-se um pouco de parafina solida (ponto de fusão 55°), de boa qualidade, como a usada para inclusões. Pinga-se 2 ou 3 gotas sobre o esfregaço, passa-se a lamina sobre uma chama até que a parafina derreta e espalha-se sobre todo o esfregaço com um bastão de vidro ligeiramente aquecido ou com o dedo. Melhor ainda será deixar espalhar a parafina colocando a lamina numa estufa a 60° (de inclusão). A temperatura de 60° não altera a coloração. Para examinar retira-se a parafina com xilol. Esse processo é um pouco incomodo para reexaminar as laminas.

5) *Alcool polivinilico* — Utilizamos uma solução aquosa a 20%, bem viscosa. Deu pessimos resultados, dissolve o corante descorando rapidamente a lamina.

6) *"Euparal"* — Esse meio de montagem é de fabricação "Grübler". Laminas com ele montadas foram expostas ao ambiente durante 6 anos. Já comunicamos os resultados após um prazo de 21 meses (2). No fim de 6 anos a parte central das preparações ainda conserva-se em boas condições, porém, nos bordos tinha havido oxidação do conservador e destruição da coloração.

7) *"Enecê"* (1) — É um meio de montagem semelhante ao "Euparal" (*). Laminas foram montadas e submetidas pelo mesmo tempo às mesmas condições que o "Euparal". Resultados provisorios tambem já foram por nós relatados (2). No fim de 6 anos, manteve a coloração em boas condições, apenas nos bordos havia desaparecimento da basofilia do citoplasma dos mononucleares, porém mesmo nessa zona da preparação as outras tonalidades e detalhes estavam bons.

8) *Sem conservador* — No nosso clima as laminas não se conservam muito bem, a duração da coloração em boas condições varia com diversas circunstancias. Precisam ser conservadas em caixas bem fechadas. Porém si consegue-se manter algumas, outras estragam-se perdendo os tons azulados e violetas, o que é de regra nas laminas alteradas com qualquer conservador.

## COMENTARIOS

O que foi observado quanto ao que se passa na 1a. fase chamada de fixação, está em desacordo com o conceito classico, de que não ha coloração nessa fase. Consequencia dessa coloração previa é o fato de se obter uma maior delicadeza e detalhe da estrutura quando se usa o corante para a fixação, em lugar de fixar com metanol e corar com solução aquosa de corante. Esse resultado é pro-

---

(*) O "Enecê" é composto de colodionia, goma copal, alcool, canfora, terebentina e eucaliptol. Agradecemos ao Prof. J. Lane que nos cedeu o "Enecê" que havia sido preparado pelo próprio autor desse meio de montagem.

vavelmente devido a que o corante em solução metilica impregna as celulas enquanto coagula as proteinas, desse modo a penetração é mais rapida e perfeita. Depois, na 2a. fase, a agua dissolvendo e precipitando as substancias corantes na intimidade da estrutura celular, daria como consequencia a diferença notada entre os dois metodos de coloração.

Está de acordo com essa nossa observação a justificativa dada por Schiling (6) para o emprego do Giemsa rapido. Afirma que o Giemsa usado desse modo (diluido com metanol), cora as granulações, estrutura nuclear, plaquetas, etc., melhor do que pelo metodo classico. Beck (5) já indicou o uso da solução de Giemsa diluido com metanol em proporções iguais á que aconselhamos.

Todos os corantes pancromicos á base de eosinato de azul de metileno, como o Leishman, Wright, Giemsa, a mistura por nós proposta (3), etc., podem ser usados segundo verificamos, de duas maneiras:

*Soluções glicerinadas tipo Giemsa* — Soluções desse tipo são usadas com as técnicas classicas na coloração em cubas, para cortes histologicos ou para a coloração simultanea de muitos esfregaços, ou ainda para gotas espessas.

*Soluções metilicas para coloração rapida* — Os corantes preparados desta maneira podem ser utilizados com a tecnica que recomendamos, que nos parece a mais pratica e é baseada nos resultados relatados.

No derorrer de preparações do azul de metileno, de eosinatos de azul de metileno, das combinações e soluções dos corantes, tivemos ocasião de verificar que no que se refere á qualidade das anilinas e solventes e tecnica de preparo das soluções ha muitos conceitos que não são validos, transmitidos pelos livros e não baseados na pratica ou em experimentação. Quase todos os que se referem a esses detalhes insistem sobre a necessidade do emprego de anilinas desta ou daquela afamada marca. Já relatamos (3) que os resultados na preparação das substancias corantes independem das marcas de anilinas usadas.

O metanol sintetico para uso industrial nos deu resultados tão bons quanto os "pro analyse". Parece-nos que a recomendação insistente de muitos autores sobre a necessidade de empregar metanol purissimo de Merck ou similares, é devido aos conselhos de outras epocas, quando o metanol não era sintético e sim proveniente da distilação da madeira, podia então conter frequentemente impurezas que prejudicavam. Atualmente com o uso quase exclusivo de metanol sintetico não é mais preciso escolher com tanto cuidado. O metanol quando absolutamente incolor sempre nos deu bons resultados. Mesmo usando metanol ligeiramente acido ao tornesol não houve modificação do corante. Por precaução neutralizamos, varias vezes com carbonato de calcio em pó, e depois, de preferecia, pondo fragmentos de marmore bem lavado e seco, que eram conservados dentro do metanol. Essa neutralização é feita depois de alguns dias ou semanas e não nos parece indispensavel.

Quanto ao preparo das soluções de corantes, inclusive do Giemsa, não apresenta dificuldades, desde que se use vasilhame bem vedado e seco, glicerina branca d=1.26 que não tenha sido exposta ao ar, e metanol incolor. O que é preciso é nunca deixar esses corantes em vidros abertos ou mal arrolhados pois que absorvem humidade o que os prejudica, tambem é necessario não introduzir no corante pipetas humidas ou sujas.

A maioria das recomendações do uso de soluções tampão, ou de adição de alcalinizantes á agua distilada, têm a finalidade de corrigir alcalinizando uma agua inicialmente não apropriada para a coloração. Já demonstramos que a ebulição por 10 minutos torna aproveitavel a agua distilada, o que é mais vantajoso do que o uso de solução tampão ou de alcalinizantes.

As soluções tampão usualmente recomendadas assim como a agua distilada adicionada de carbonato de sodio não apresentam vantagens sobre a agua distilada quanto á conservação. Todas elas estragam-se da mesma maneira quando expostas ao contato do ar devido ao gaz carbonico que as acidifica e, os corantes pancromicos são sensiveis ao acido carbonico.

Si bem que os corantes pancromicos para dar o maximo de resultado exijam um pH 7.0 ou muito proximo, pois são corantes neutros e como tais muito sensiveis a acidos e alcalis, ás vezes para fins especiais necessita-se corar com um pH acido ou alcalino. Nesses casos é conveniente que se empreguem soluções tampão para regularidade e melhor reprodução das colorações, é então aconselhavel usar misturas de fosfatos de sodio e potassio, observando concentrações de sal dentro dos limites que referimos ao tratar do assunto. A solução tampão aconselhada por Lacorte (4) tem um pH 7.4 que é o mais conveniente para a coloração de parasitos.

## CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos chegamos á conclusão que é mais aconselhavel o uso de corantes em solução metilica que devem ser utilizados para a fixação e, a diluição do corante deve ser feita sobre o esfregaço. O uso de solução tampão ou agua alcalinizada é desnecessario a não ser para fins especiais, a agua distilada recente ou recentemente fervida durante 10 minutos, dentro de prazo de 1 semana dá boas colorações para o uso corrente.

### *Método de coloração*

A tecnica de coloração rapida que parece ser a mais pratica e pode ser usada com todos os corantes em solução metilica é a seguinte:

1) Cobrir o esfregaço com 0.5 ml. de corante. Deixar 1 a 2 minutos.

2) Juntar ás gotas. 1 ml. de agua. misturar bem. deixar 5 a 7 minutos. Para hematozoarios, outros parasitos ou laminas muito ricas em celulas nucleadas (leucemias, medula ossea. etc.). deixar corando mais tempo. cerca de 10 minutos.

3) Não despejar o corante. Lavar com um jato de agua. da mesma que foi utilizada para a coloração, escorrer e secar rapidamente em papel de filtro, mata-borrão ou secador de ar quente.

## *Dados praticos sobre colorações*

*Modo de misturar o corante* — Um bom metodo para misturar o corante com a agua, no momento da diluição. é o seguinte: toma-se um bastão de vidro que se coloca paralelamente sobre a lamina e toca-se a superficie do liquido. com o liquido aderido ao bastão por capilaridade (fig. 1). agita-se varias vezes de um lado para o outro (fig 2). destacando o bastão da superficie. Repete-se essa manobra cerca de 5 vezes consecutivas. O bastão não precisa ser lavado. desde que usado só para esse fim.

FIG. 1

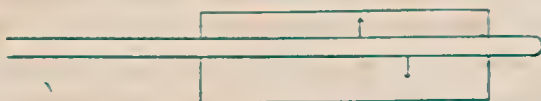



FIG. 2

*Lavagem da lamina* — A agua distilada ou a solução tampão para a lavagem deve de preferencia ficar num frasco ou balão lavador de cerca de 500 ml, (fig. 3). Lavar despejando um jato firme que se vai fazendo correr sobre toda a superficie da lamina rapidamente. Para isso gasta-se cerca de 20 ml. de agua. Deste modo evita-se o deposito de precipitados sobre o esfregaço. A lavagem ao mesmo tempo diferencia a lamina e é um dos tempos mais delicados de uma boa coloração. Deve em geral durar cerca de 10 segundos.

FIG. 3

*Diferenciação* — Caso a diferenciação não tenha sido suficiente, o que se reconhece pelo tom carregado das hemacias, limpar o oleo de cedro e tornar a diferenciar recobrindo com a agua distilada ou solução tampão, deixando cerca de 20 a 30 segundos.

*Medição do corante e da agua para coloração* — Sendo os corantes pancromicos muito delicados, alterando-se facilmente com acidos, alcalis, humidade, esposição ao ar, etc., é conveniente não mergulhar pipetas sujas ou humidas no vidro de corante. Afim de evitar esses riscos é aconselhavel o seguinte metodo que nos têm dado bons resultados ha cerca de uma dezena de anos:

Guardar o corante e a agua ou solução tampão para diluição, em frascos conta-gotas de vidro de boa qualidade. Para o corante, contar o numero de gotas necessarias para encher 5 cm3 de um pequeno provete de 5 ou 10 cm3 bem graduado. Dividindo-se por 10 obtem-se o numero de gotas que corresponde a 0,5 ml de corante, numero esse que é marcado definitivamente no rotulo do vidro. Vidro con-tagotas com rolha pipeta facilita ainda mais o trabalho por evitar a contagem de gotas de cada vez. Para esses procede-se do seguinte modo: retira-se o bulbo de borracha, fecha-se a extremidade inferior com o dedo e pelo orificio superior, com uma pipeta fina põe-se 0,5 ml de metanol ou alcool, que facilitam a operação. Marca-se o nivel de liquido com um diamante e depois aprofunda-se bem a marca para que fique bem visivel. Desse modo de cada vez que se vai corar com o vidro conta-gotas basta despejar o numero exato de gotas ou, com o segundo vidro, encher a pipeta, esvasia-la no vidro até a marca e, depois, despejar a quantidade medida sobre a lamina a corar. Procede-se da mesma maneira para a agua empregada na diluição.

*Correção de erros de coloração* — Laminas hipercoradas — Diferenciar como foi explicado anteriormente. Quando se quizer verificar melhor a policromasia, pontilhado basofilo ou outras modificações das hemacias, proceder do mesmo modo.

Laminas hipocoradas — Si possivel, corar outro esfregaço, sinão, cobrir com metanol, deixar 1/2 minuto, despejar e repetir. Secar a lamina. Corar novamente desde o primeiro tempo.

Laminas precipitadas — Proceder do mesmo modo que no caso anterior.

*Idade dos esfregaços* — Os esfregaços não corados devem ser guardados não fixados. Até 2 ou 3 dias dão colorações muito boas, porém no mesmo dia obtem-se resultados melhores. Quanto mais velhos peor será a coloração, chegando a não se corar quando muito velhos.

*Conservação de laminas coradas* — Para a conservação das laminas o mais aconselhavel é retirar bem o oleo de cedro logo depois de examinar e guardar o mais possivel abrigado do ar e de emanações acidas ou alcalinas, o que se pode fazer em caixas ou gavetas bem fechadas.

Caso se queira fazer demonstrações repetidas é preferivel montar com "Enecê" e laminula. Para tentar conservar por prazos muito longos pode ser usada a parafina solida.

## RESUMO

Foram estudados varios fatores que têm influencia nas colorações pancromicas, na preparação de soluções corantes e na conservação das laminas coradas. Foram obtidas as seguintes conclusões:

Todos os corantes pancromicos usuais podem ser usados em soluções glicerinadas tipo Giemsa ou soluções metilicas. O seu preparo é facil e ao alcance de qualquer laboratorio.

Os corantes em solução metilica, na 1a. fase, chamada de fixação, não agem somente fixando, na realidade nessa fase inicia-se a coloração.

Diluindo o corante sobre a lamina obtem-se uma coloração com estrutura nuclear e citoplasmatica mais fina e delicada do que fixando previamente os esfregaços com metanol e corando com corante diluido aparte. Os corantes metilicos são os mais aconselhaveis.

O volume de corante mais conveniente para a fixação e coloração de um esfregaço é de 0.5 ml.

O melhor tempo para a primeira fase, chamada de fixação, é de 1 minuto, e de 2 minutos para laminas muito recentes.

O melhor volume de agua que recobre bem a lamina e permite uma boa mistura é de 1.0 ml.

A melhor relação entre volume de corante metilico e de agua é de 1/2.

A agua distilada recente ou recentemente fervida, dentro do prazo de 1 semana, dá boa coloração, não sendo necessario usar soluções tampão, agua alcalinizada com carbonato de sodio ou outros meios. Somente são necessarias soluções tampão para fins especiais.

A concentração de sais nas soluções tampão tem importancia na coloração e devem ser de preferencia menor do que 1%.

A lamina deve ser lavada com a mesma agua ou solução tampão utilizada na coloração.

Para a conservação das laminas o mais aconselhavel é guardar o esfregaço bem limpo, sem oleo de cedro, em caixas ao abrigo do ar e de emanações acidas ou alcalinas. Caso necessario pode ser usada a parafina solida ou o "Enecê".

ABSTRACT

Various factors which influence panchromic staining were studied in the preparations of stains solutions and in the conservations of stained smears. The following conclusions were reached:

All common panchromic stains may be used in solutions with glycerine of the Giemsa type, or in methylic solutions. Their preparation is simple and within the reach of any laboratory.

The stains, when used in a methylic solution in the first stage, which is called fixation, do not act by fixing exclusively, but in reality staining begins during this phase.

By diluting the stain on the smear, a finer and more delicate nuclear and cytoplasmatic structure is obtained than when methanol was used previously to fix the smear, and after were colored with stain diluted separately. The methylic stains are the most advisable.

The most convenient volume of the stain, to be used for fixation and coloration of a smear is 0,5 ml.

The best time for the first phase (fixation) is 1 minute, and 2 minutes for very recent smears.

The best volume of water to be employed for dilution over the slide and which permits a good mixture, is 1,0 ml.

The best relation between the volume of methylic stain and water is 1/2.

Water, recently distilled or recently boiled, within a period of 1 week, gives a good stain. It is not necessary to use buffer solutions, water alkalised with soda carbonate or other means. Buffer are necessary only for special purposes

The concentration of salts in buffer solutions are important in staining and should preferably be less than 1%.

The smear should be washed with the same water or buffer solution used in staining.

For the conservation of slides it is advisable to keep the stained smear very clean, without cedar oil, in air-proof boxes to avoid acid or alkaline emanations. If necessary, solid paraffin or "Enecê" may be used.

BIBLIOGRAFIA

1. *Cerqueira, M. L.* — Um novo meio para montagem de pequenos insetos em laminas, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **39**:37, 1943.
2. *Rosenfeld, G.* — Nota sôbre a experiência de conservação de laminas de sangue com Enecê, *Rev. Paul. de Med.*, **23**:43, 1944.

3. *Rosenfeld, G.* — Corante pancromico para hematologia e citologia clinica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*. **20**: 329. 1947.

4. *Lacorte, J. G.* — Influência do pH sôbre as colorações do Giemsa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Suplemento 1: 9. 1928.

5. *Beck, R. G.* — Laboratory manual of hematologic technic, Philadelphia, Saunder Co., 1938, pp. 145.

6. *Schilling, V.* — El cuadro hematico y su interpretacion clinica, ed. 3, trad. da ed. 10 alemã, Barcelona, Editorial Labor, 1936. pp. 18-19.

# CORANTE PANCROMICO PARA HEMATOLOGIA E CITOLOGIA CLINICA. NOVA COMBINAÇÃO DOS COMPONENTES DO MAY-GRÜNWALD E DO GIEMSA NUM SÓ CORANTE DE EMPREGO RAPIDO

por G. ROSENFELD

*(Do Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)*

A preferencia pelos corantes de Wright e Leishman é devida a simplicidade de sua tecnica e pouco tempo exigido na coloração, apesar de seus resultados serem reconhecidamente inferiores aos da coloração combinada de May-Grünwald e Giemsa ou metodo de Pappenheim; que segundo a opinião da maioria dos hematologistas é o mais rico em detalhes.

Apesar de vantagens incontestaveis o metodo de Pappenheim não é o mais usado nem o mais recomendavel devido a sua tecnica um pouco complicada e muito demorada para um trabalho massiço de rotina. Exige atenção pois são necessarias diversas manipulações, e variações destas têm como consequencia irregularidade nos resultados. O Giemsa isolado é de tecnica mais simples, porém exige um tempo relativamente demorado e seus resultados são inferiores aos do metodo de Pappenheim. A evidencia desses inconvenientes é demonstrada pela tendencia a utilizar cada vez mais o Wright e o Leishman, e tambem pelas tentativas de simplificar o Pappenheim.

Varios autores já indicaram simplificações afim de diminuir as manipulações da tecnica e encurtar o tempo. Nazim (2) em 1920 propôz uma mistura de 2 partes de solução de May-Grünwald e 1 de solução de Giemsa, o esfregaço é fixado cobrindo com o corante durante 1 minuto e corado, juntando igual volume de agua que se deixa permanecer durante 1 a 2 minutos. Não obtivemos bons resultados com esse metodo. A concentração que esse autor indica para a solução de May-Grünwald é de 1%, portanto 4 vezes maior do que a usual, usando esse corante com a concentração normal, 0,25%, obtivemos resultados melhores porém chegamos à conclusão que esse metodo tem o grave inconveniente de usar tempo demasiadamente curto o que ocasiona variações muito grande nas colorações. Strumia (4) em 1936 recomenda uma mistura de Giemsa e May-Grünwald em pó, dissolvidos segundo tecnica especial em glicerina, metanol e acetona. O corante corresponde mais ou menos a uma proporção final de 170 ml. de solução

Recebido para publicação em 27 de outubro de 1947.

de Giemsa, mais 60 ml. da solução de May-Grünwald, com 460 ml. de acetona e 310 ml. de metanol. Cora usando 1 ml. do corante que fixa durante 2 minutos, e juntando depois 1 ml. de agua alcalinizada que permanece 3 minutos. O corante conserva-se durante 18 meses.

Como os melhores resultados para verificação de detalhes morfologicos de importancia no trabalho corrente, segundo o consenso quase unanime é dado pela coloração combinada do May-Grünwald e Giemsa, foi estudada uma combinação desses corantes que permitisse uma coloração com essas vantagens associadas a um metodo de coloração facil e rapido. Noutro trabalho (3) foram determinados os requisitos ideais que deve apresentar o metodo de coloração para esfregaços de sangue. O corante foi preparado após numerosas tentativas, até que se encontraram concentrações e proporções otimas, para ser utilizado dentro das condições do metodo deduzido como o melhor no trabalho citado.

## MATERIAL E METODOS

Na preparação dos corantes usamos azul de metileno para uso medicinal, eosina amarelada (tetrabromo-fluoresceina sodica), eosina azulada (dibromo-dinitro-fluoresceina sodica) e metanol sintetico. Empregamos essas substancias de diversas procedencias, com bons resultados.

O azul de metileno, azul A de Kehrmann, foi preparado pelo metodo de Mac Neal utilizado por Meyer (1).

As colorações foram sempre feitas em esfregaços usuais não fixados, de sangue humano, do dia ou no maximo do dia anterior.

O metodo de coloração empregado foi o recomendado em outro trabalho (3) e deve se submeter ás seguintes condições:

1) A fixação do esfregaço deve ser feita pelo proprio corante que deve estar em solução metilica. Essa fixação deve durar 1 minuto usualmente e 2 minutos para esfregaços muito recentes (alguns minutos depois de preparados).

2) O volume de corante a empregar nessa primeira fase deve ser de 0,5 ml.

3) O segundo tempo deve ser feito com agua destilada previamente fervida durante 10 minutos e utilizada até 1 semana depois. Pode ser empregada uma solução tampão diluida, com pH bem proximo da neutralidade. Esse segundo tempo deve durar 5 minutos ou um pouco mais. Para hematozoarios, outros parasitos ou laminas muito ricas em celulas: medula, ganglio, leucemia, etc., deve-se prolongar o tempo para 10 minutos. Para laminas muito pobres em celulas: anemias muito intensas, agranulocitose, etc., a duração deve ser reduzida para cerca de 3 minutos. De um modo geral esses tempos não precisam ser ne-

cessariamente observados com rigor, pequenas flutuações não têm grande influencia.

4) No segundo tempo o volume do diluente a empregar deve ser de 1.0 ml ou seja, o dobro do volume do corante.

5) A lavagem da lamina deve ser feita com agua distilada ou solução tampão, porém a mesma que se usou para a coloração. Despeja-se um jato franco primeiramente num dos extremos e depois passa-se pelo resto da lamina. Toma-se a lamina por um dos extremos, despeja-se o liquido e imediatamente enxuga-se em papel de filtro ou de preferencia, si o volume de trabalho justificar, emprega-se a corrente de ar quente de um dessecador de cabelo, instalado sob a mesa, com a abertura voltada para cima justaposta a um orificio feito na mesa. Quanto mais tempo a lamina permanecer molhada nessa fase de lavagem mais descorada ficará.

## RESULTADOS

Dentro dos detalhes da tecnica previamente fixada e das condições exigidas, partindo de dados arbitrarios fomos variando a concentração de componente por componente, enquanto os outros eram mantidos fixos. Chegamos, após mais de uma centena de tentativas, ás seguintes proporções que nos deram as melhores colorações:

*Formula A*

| | | |
|---|---|---|
| Azur A ........................................ | 0,342 | gr |
| Eosina amarelada ................................ | 0,342 | gr |
| Azul de metileno ................................ | 0,286 | gr |
| Eosinato de azul de metileno ..................... | 0,530 | gr |
| Metanol q. s. .................................... | 1.000,0 | ml |

O mesmo corante pode ser obtido utilizando Giemsa e May-Grünwald em pó, nas seguintes proporções:

*Formula B*

| | | |
|---|---|---|
| Giemsa em pó .................................. | 0,97 | gr |
| May-Grünwald em pó ............................ | 0,53 | gr |
| Metanol ........................................ | 1.000,0 | ml |

Tambem podem ser utilizadas soluções de Giemsa e de May-Grünwald para chegar ao mesmo corante:

*Formula C*

| | | |
|---|---|---|
| Giemsa em solução ................................ | 125 | ml |
| May-Grünwald em solução ......................... | 215 | ml |
| Metanol .......................................... | 660 | ml |

O corante em pó era preparado misturando os corantes das formulas A ou B. e juntando cerca de 200 ml de metanol para 10 gr de corante; afim de dissolver depois de evaporado era triturado.

Para fazer a solução metilica usual o corante em pó era dissolvido na proporção de 0,15 g % em metanol. Agitava-se diversas vezes enquanto se conservava ao ambiente em vidro bem arrolhado durante 24 horas. Filtrava-se e o corante ficava pronto para usar. Essa solução metilica tambem pode ser preparada a partir da solução glicerinada, diluindo 1 parte desta ultima com 4 partes de metanol.

A solução glicerinada tipo Giemsa para coloração pelas tecnicas classicas, de cortes histologicos ou de muitas laminas simultaneamente em cubas, é preparada da seguinte maneira: 0,75 g % de corante numa mistura em partes iguais de metanol e glicerina pura com d = 1,26. Agita-se diversas vezes enquanto se conserva 2 a 6 horas a 60°, ou cerca de 12 horas a 37°. Cerca de 24 horas depois filtra-se e está pronta para usar.

O corante em pó e as soluções guardadas bem fechadas conservaram-se bem até cerca de 8 anos, periodo em que tivemos ocasião de observar. Temos usado continuamente o corante durante todo esse tempo com muito bons resultados, para esfregaços de sangue, medula, baço, ganglio, tumores, pús, sedimentos de derrames e todo o genero de exames citologicos clinicos.

## COMENTARIOS

O corante obtido reune todos os componentes do Giemsa e do May-Grünwald dando quase os mesmos resultados e os mesmos valores que os obtidos com o metodo de coloração combinada desses dois corantes, ou metodo de Pappenheim. As principais vantagens que apresenta são: exigir pouco tempo de coloração, tecnica muito simplificada e resultados muito regulares mesmo em mãos inexperientes, desde que sejam seguidas á risca todas as indicações.

A diferença que apresenta na coloração em relação ao metodo de Pappenhein é que as celulas mostram uma estrutura nuclear e citoplasmatica muito mais fina e delicada, o que tem muito valor para avaliar o estadio de maturação da celula e para o diagnostico diferencial de celulas patológicas o que é de grande importancia em certos diagnosticos, como na mononucleose, leucemias agudas, etc. Essa vantagem é principalmente devida a que as substancias corantes em lugar de agir sob a forma de solução aquosa em celulas já fixadas, agem já na primeira fase, a de fixação, enquanto ainda em solução metilica, o que como já demonstramos (3), apresenta grandes vantagens.

A unica inferioridade do metodo dentro do tempo e metodo padrão, é no que se refere á coloração de hematozoarios. Os *P. vivax, falciparum* e *malariae* em todos os estadios evolutivos ficam corados e perfeitamente diagnosticaveis, o

mesmo pode-se dizer quanto á demonstração dos pigmentos, porém a coloração não atinge a intensidade dada por outros corantes como o Giemsa, o Leishman e o Wright. Para que nesses casos se obtenha coloração igual, é preciso prolongar o tempo de coloração para 10 minutos, tempo mais recomendavel para todos os parasitos. Para esse fim tambem é mais indicado o emprego de solução tampão pH 7,2 ou 7,4 o que aliás se estende ao uso de todos os corantes desse genero.

Na preparação dos corantes usamos anilinas de muitas proveniencias, tanto de marcas alemãs como americanas, umas para fins de laboratorio, outras para uso farmaceutico e eosina amarelada para uso industrial. Os resultados foram sempre bons, as pequenas variações encontradas entre uma partida e outra resultavam sempre da preparação do azur de metileno ou do eosinato de azul de metileno, que apresenta quase sempre pequenas variações de partida para partida, porém de uma intensidade que não altera os resultados praticos. Os resultados obtidos com eosina amarelada e eosina azulada foram identicos, e não ha vantagem em empregar esta ultima, em geral mais dificil de ser obtida do que a primeira.

RESUMO

É apresentada uma nova combinação corante pancromica com os componentes do May-Grünwald e Giemsa, para esfregaços de sangue, exames citologicos clinicos e cortes histologicos. Ao lado, sobre as colorações de Wright e Leishman apresenta as qualidades da coloração combinada de May-Grünwald e do Giemsa, ou metodo de Pappenheim, e sobre este ultimo tem vantagens. O seu metodo de emprego é mais rapido e simples e mostra uma estrutura nuclear e citoplasmatica mais delicada. É de facil preparo e durante anos não foi observada nenhuma alteração das suas propriedades.

ABSTRACT

A new pancromic stain made with the components of May-Grünwald and Giemsa, is presented for staining blood smears, histological slides and smears for clinical cytologic examinations. When compared with the Wright and Leishman stains, it has the qualities of the Pappenheim method (May-Grunwald and Giemsa combined staining), and has over the later many advantages. Its application is more rapid and simpler to used, and it shows a more delicate nuclear and cytoplasmatic structure. It is easily prepared and no alteration of its properties was observed during a period of many years.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Meyer, J. P.* — Noções práticas sobre a preparação e emprego de um corante semelhante à mistura de Giemsa (Azul-Azul-Eosina), *Arch. Instituto Biológico,* **6**:97, 1935.

2. *Nazim, E.* — Modification de la methode de Pappenheim, *Presse Medicale, n.* **23**: 424, 1920.

3. *Rosenfeld, G.* — Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sôbre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores, *Mem. Inst. Butantan,* **20**: 315, 1947.

4. *Strumia, M.* — A rapid universal blood stain; May-Grüwald Giemsa in one solution, *Jour. Lab. & Clin. Med.,* **21**: 930, 1936.

# PESQUISAS DE CITOLOGIA QUANTITATIVA. V: ESTUDO CARIOMÉTRICO DAS CÉLULAS FOLICULARES E LUTEINICAS

POR CARLOS ALBERTO SALVATORE (*) E GIORGIO SCHREIBER (**)

*(Do Laboratório de Citogenética, do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)*

## INTRODUÇÃO

### a) Plano de Trabalho

Em prosseguimento ás pesquisas cariométricas sôbre tecidos em ativa reprodução e, com o intuito de investigar o crescimento nuclear durante a interfase iniciadas por um de nós (Schreiber), foi estudado o volume do núcleo das células da granulosa do folículo de Graf nas suas diferentes fases evolutivas desde o estadio do folículo primordial até a rutura e sua transformação em célula lutea.

Estas pesquisas fazem parte das que vem sendo executadas neste laboratório há alguns anos, utilizando-se para o estudo da interfase as modificações induzidas num determinado tecido por fatores fisiológicos específicos, quando estas modificações atuam por meio da multiplicação dos elementos específicos do tecido.

O estudo do ciclo fisiológico de um órgão em consequência da ação de diferentes hormônios ou de diferentes limiares de concentração de um mesmo hormônio, a sua colocação em repouso consequente da ablação do órgão endócrino correspondente, como também, a substituição em dóses maciças administradas do mesmo hormônio nestes animais privados da glândula, constituem os meios que o citologista pode utilizar para obter as células nas diferentes condições reprodutivas.

Como foi demonstrado nas pesquisas precedentes, as células uterinas respondem a estimulação hormônica com fenômenos de proliferação e de paradas desta proliferação, que podem ser controladas pelo pesquisador conforme as condições fisiológicas experimentalmente alteradas. Com estas pesquisas foi possível demonstrar que o crescimento "ritmico" dos núcleos é uma manifestação do crescimento interfásico, como também estabelecer os limites quantitativos do crescimento interfásico dos núcleos.

---

Recebido para publicação em 10-11-1947.

(*) Da Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo.
(**) Do Instituto Butantan (Laboratório de Citogenética).

Os intensos fenômenos multiplicativos das células granulosas e o aumento do tamanho das células luteinicas na sua origem e durante o crescimento do corpo amarelo na prenhez, nos induziram a tentar a aplicação das pesquisas cariométricas neste material, esperando também trazer uma contribuição ao problema da origem de célula lutea (*).

b) *O problema da formação do corpo amarelo.*

A formação do corpo luteo é assunto ainda não perfeitamente estabelecido, porquanto, segundo a opinião de um grupo de autores (4, 5, 9 e outros), essa glândula deriva das células da granulosa e, segundo outros (4) das células da téca interna.

Pelas recentes pesquisas, parece porém, não haver dúvida de que o corpo amarelo deriva pela maior parte das células da granulosa, através da hipertrofia dessas células.

Experimentalmente, com a utilização do método da colchicina, numeroros autores, entre os quais Allen (1) e Hoffman (8), encontraram diversas mitoses nas células da granulosa principalmente no período pré-ovulatório e, mesmo após a rutura do foliculo, dando a impressão de existir grande hiperplasia durante a formação do corpo amarelo. Porém, Schmidt (18) refere que a proliferação endotelial é a maior responsavel pelas mitoses encontradas durante a formação do corpo luteo e, a grande maioria dos autores (1, 11, 10 e outros), afirmam que além das células luteas derivarem das células da granulosa, o aumento do corpo amarelo é consequente á hipertrofia celular.

Por conseguinte, parece estar demonstrado que sob a ação do hormônio hipofisario luteinizante, as células da granulosa se transformam em luteas e, que provavelmente as células foliculares que ainda entram em mitoses sejam aquelas que ainda estão sob a ação do hormônio gonado-estimulante folicular. Existiria portanto, uma verdadeira transformação celular tanto sob o aspécto morfológico como fisiológico. Assim, as células da granulosa que segundo vários autores secretam estrogenos, após essa transformação começam também a secretar outro hormônio, a progesterona.

Achamos interessante relatar detalhadamente esta situação do problema da origem das células luteas, pois as relações quantitativas entre os volumes nucleares das celulas luteas e as da granulosa nos indicam uma provável relação de origem entre estas duas categorias de células. A demonstração certa desta relação nos seria fornecida pelo estudo comparativo das células da téca, isto é, células de

(*) Devemos aqui assinalar o trabalho de E. Hintsche (Monatschr. Geburtsh. u. Gynaek. **120**: 200, 1945) sôbre o tamanho nuclear das células foliculares e luteinicas humanas, que não nos foi possivel consultar até esta data. Pesquisas atualmente em curso por um de nós (Salvatore) sôbre o mesmo assunto parecem revelar que os mesmos fenômenos encontrados na rata se verificam também na mulher.

aspécto luteínico que se encontram no conjuntivo da téca interna do folículo de Graf, e que como relatamos acima, alguns autores consideram, ao menos em parte, como as células progenitoras das células luteas.

O estudo destas células apresenta maiores dificuldades do que o das outras categorias de células ovarianas, pela relativa raridade pelo menos na rata. Apesar do interesse embriológico e endocrinológico deste estudo comparativo, no presente trabalho deixamos de lado este problema que será relatado em trabalho sucessivo. Da mesma forma, deixamos para outro trabalho o problema do volume nuclear das células intersticiais que num ensaio preliminar revelou fenômenos interessantes de variações cíclicas que merecem uma apresentação mais detalhada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a) *Material*

Foram estudados os ovários de ratas da raça Wistar criadas no Instituto Butantan que foram contemporaneamente utilizadas para as pesquisas cariométricas dos tecidos uterinos (13). Em total foram estudados 14 casos (Tabela 1) nas diferentes fases fisiológicas que agrupamos da seguinte forma:

1) Folículos primordiais: dois grupos pertencentes a ovários diferentes.

2) Folículos em pleno desenvolvimento.

3) Folículos em transformação lutea.

4) Corpos amarelos transitórios.

5) Corpos amarelos gravídicos.

### b) *Métodos*

Os ovários foram colhidos sempre com narcose pelo eter e fixados em Bouin alcoólico (Duboscq-Brasil) preparados em parafina e corados em Hematoxilina de Harris ou Heidenhain e eosina em córtes de 10 microns.

As medidas foram executadas com os mesmos princípios usados nos trabalhos precedentes (17.13), os quais resumimos brevemente. O núcleos (100-300) desenhados com a câmara lúcida a uma ampliação de 1890 diâmetros são medidos no desenho com um papel milimetrado transparente. Os núcleos são considerados esféricos o que em realidade se dá no corpo amarelo, ao passo que os núcleos da granulosa são frequentemente elipsoidicos. Pelo fato de não serem absolu-

tamente orientados, a medição deve ser feita como esfera de diâmetro médio entre os dois diâmetros (maior e menor) do núcleo desenhado.

Agrupados os valores em classes de 0, 5mm foram construidos os histogramas das frequências e calculados os valores modais, com (1) Arkin e Colton (2) e o valor modal dos diâmetros transformado em volume da esfera correspondente ($V = d^3 : 1,91$). A Tabela 1 indica juntamente com os valores das frequências dos diâmetros, também os valores modais dos volumes calculados.

O critério teórico que preside a escolha dêste procedimento já foi discutido minuciosamente nos trabalhos antecedentes. Lembramos sómente que numa massa homogênea de núcleos em ativo crescimento interfásico, os núcleos que apresentam uma diminuta velocidade dêste crescimento ou uma parada, aparecem no estudo cariométrico-estatístico como classes de máxima frequência. Portanto, os volumes modais representam os volumes nucleares nos quais os núcleos param depois de acabado um período de crescimento. Êste tipo de crescimento com diferentes velocidades alternadas com paradas é chamado "crescimento rítmico" ou "periódico" e, a sua significação causal já foi discutida nos trabalhos citados.

Nos folículos onde se encontram mitoses, foi calculado o *index mitotico* ou seja o número de mitoses em 100 núcleos medidos. Este valor também está na Tabela 1.

Nos foliculos em que as mitoses aparecem com maior frequência, foi possível também medir algumas profases. O volume dêste estadío do ciclo nuclear foi por nós considerado em trabalhos anteriores com particular atenção, pois constitui uma etápa fixa do ciclo nuclear e praticamente delimita o fim de um ciclo de crescimento interfásico e contemporaneamente permite deduzir a natureza interfásica das variações volumétricas ciclicas observadas.

Com os dados da Tabela 1, foram construidos os histogramas da Fig. 1.

Com os valores modais foi construido o gráfico da Fig. 2 que indica claramente as relações quantitativas entre estes valores.

Apesar de que o exame de cada histograma isolado poderia sugerir dúvidas em sentido puramente estatístico sôbre a realidade das modas que nelas aparecem, o exame comparativo do conjunto de todos os histogramas revela uma perfeita correspondência entre estes valores modais nos diferentes casos estudados e, como será evidenciado mais adiante, às vezes uma moda que é secundaria num estadío, torna-se moda principal num outro estadio, evidenciando assim a realidade biológica dêste valor consequente ao tipo de crescimento ritmico do material estudado.

Tabela I.

| N. do Protocolo | FASES | VALOR MODAL (Volume) | | | | | | | | DIAMETRO NÚCLEAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | N. de núcleos | Indice Mitotico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | 9 | 9,5 | 10 | 10,5 | 11 | 11,5 | 12 | 12,5 | 13 | 13,5 | 14 | 14,5 | 15 | 15,5 | 16 | 16,5 | 17 | 17,5 | 18 | 18,5 | 19 | 19,5 | 20 | | |
| 1 | Folículo primordial | | 606 | | | | | | | 1 | 11 | 17 | 32 | 21 | 7 | — | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 93 | 0. |
| 8 | » | | 687 | 1023 | | | | | | | 1 | 3 | 7 | 18 | 6 | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | 45 | 0. |
| 4 | Folículo em desenvolvimento | | 678 | 1010 | | | | | | | | 1 | 15 | 28 | 7 | 27 | 29 | 18 | 13 | 12 | 4 | 1 | | | | | | | | | | | 158 | 2,5 |
| 7 | » | | 678 | 1010 | 1406 | | | | | | | 6 | 11 | 15 | 6 | 30 | 37 | 25 | 23 | 29 | 11 | 4 | 1 | | | | | | | | | | 201 | 9,8 |
| 13a | » | 531 | 715 | 1023 | 1406 | | | | | | 6 | 34 | 10 | 28 | 20 | 25 | 17 | 29 | 22 | 45 | 20 | 1 | | | | | | | | | | | 277 | 6,4 |
| 13b | » | 547 | 715 | 968 | 1436 | | | | | | 2 | 15 | 8 | 13 | 23 | 30 | 11 | 9 | 15 | 25 | 15 | 5 | | | | | | | | | | | 234 | 6,8 |
| 30 | Folículo em transformação lutea | | 715 | 1010 | 1391 | | | | | | 1 | 8 | 7 | 21 | 17 | 9 | 26 | 7 | 8 | 16 | 3 | 2 | | | | | | | | | | | 125 | 1,5 |
| 13a | » | | | 1013 | 1406 | | | | | | | 2 | — | 3 | 1 | 1 | 10 | 8 | 6 | 11 | 3 | 5 | 1 | | | | | | | | | | 60 | 1,6 |
| 9 | Corpo luteo | | | | 1421 | | | 3386 | | | | | | | | | 2 | 8 | 20 | 35 | 22 | 20 | 15 | 8 | 3 | — | — | — | 1 | 1 | | | 115 | 0. |
| 10 | » | | | | 1156 | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 24 | 28 | 48 | 40 | 12 | 1 | 1 | | | | | | | | | 158 | 0. |
| 26 | » | | | | 1121 | | | | | | | | | | | | 7 | 12 | 31 | 31 | 29 | 18 | 2 | 1 | | | | | | | | | 131 | 0. |
| 8 | » | | | | 1121 | | | | | | | | | | 2 | 6 | 4 | 10 | 18 | 26 | 15 | 8 | 1 | | | | | | | | | | 90 | 0. |
| 38 | Corpo luteo gravidico | | | | 1462 | 2065 | 2961 | 3380 | 4314 | | | | | | 4 | 5 | 7 | 14 | 43 | 37 | 20 | 12 | 26 | 5 | 1 | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 225 | 0. |
| 22 | » | | | | 1136 | 2112 | 3104 | | 4001 | | | | | | | | 1 | 6 | 18 | 33 | 27 | 21 | 17 | 36 | 12 | 10 | 3 | 10 | 9 | 1 | 4 | 5 | 213 | 0. |
| 13a,b 17 | Profases foliculares | | | | 1436 | | | | | | | | | | | | | | 6 | 8 | 6 | 1 | | | | | | | | | | | 21 | — |
| | Media das modas | 599 | 685 | 1012 | 1123 | 2088 | 2961 | 3270 | 4157 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

## RESULTADOS

a) *Folículos primordiais* (Prot. 1 e 8):

Designamos como *folículos primordiais* e revestimento de uma só camada de células foliculares ao redor do ovocito. Como cada folículo é composto de um número reduzido de células, reunimos os dados das medidas de mais ou menos uma dezena de folículos primordiais dos ovários pertencentes a um mesmo animal.

Os dois animais sôbre os quais as medidas foram feitas estavam ambos em diestro. Os histogramas possuem um único máximo ao valor da classe de diâmetro 11 — 11.5. Num caso existe uma ligeira tendência a uma moda na classe 13. Em nenhum caso foi encontrado mitoses. Estes dados são representados na Fig. 1.

b) *Foliculo em desenvolvimento* (Prot. 4, 7, 13a e 13b):

O folículo em fase de desenvolvimento representa um tecido homogêneo em grande atividade mitótica e fornece um campo de pesquisa de grande interesse. Os histogramas (Fig. 1) ilustram o quadro cariométrico desta fase que provem de dois animais respectivamente em proestro (n. 7) e estro (n. 13b). De cada folículo foram medidos aproximadamente 200 núcleos. Todos apresentam três distintos valores modais respectivamente nas classes de diâmetro de vol. modais aproximados: 11 — 12.5 — 14 (vol. 700, 1050, 1400). Em dois casos (n. 13a-b) aparece um valor modal ao diâmetro 10. Não podemos dar a este valor modal uma significação precisa por ser sómente ligeiramente acentuada e não na totalidade dos casos estudados. Não podemos excluir que estes núcleos pequenos sejam telofásicos, porém, numa pesquisa que será objeto de um trabalho sucessivo sôbre as células intersticiais do ovário, encontramos este valor modal na classe 10 como moda principal desta categoria de células.

Nos folículos em desenvolvimento se encontram numerosas mitoses. As profases medidas isoladamente tem um valor modal na classe 14 (vol. 1400), isto é, coincide perfeitamente com o terceiro valor modal dos núcleos interfásicos.

A frequência das mitoses nestes folículos, por nós encontrada é mais ou menos de 6 a 10%, algarismo este que coincide satisfatóriamente com os dados conhecidos na literatura (Micr. Fig. 4).

TABELA II
*Diâmetro Nuclear*

| N. do protocolo | Folículo em transformação lutea | Valor Modal (volume) | | | 10 | 10,5 | 11 | 11,5 | 12 | 12,5 | 13 | 13,5 | 14 | 14,5 | 15 | 15,5 | 16 | N. de núcleos | Indice mitótico |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | Zona central (B) | 715 | 998 | 1406 | 2 | 4 | 11 | 10 | 9 | 21 | 8 | 3 | 1 | 2 | | | | 74 | 1,3 |
| 13 | Zona periferica (A) | | | 1436 | | | 2 | 1 | 3 | 4 | 8 | 5 | 20 | 6 | 2 | 2 | 2 | 54 | — |

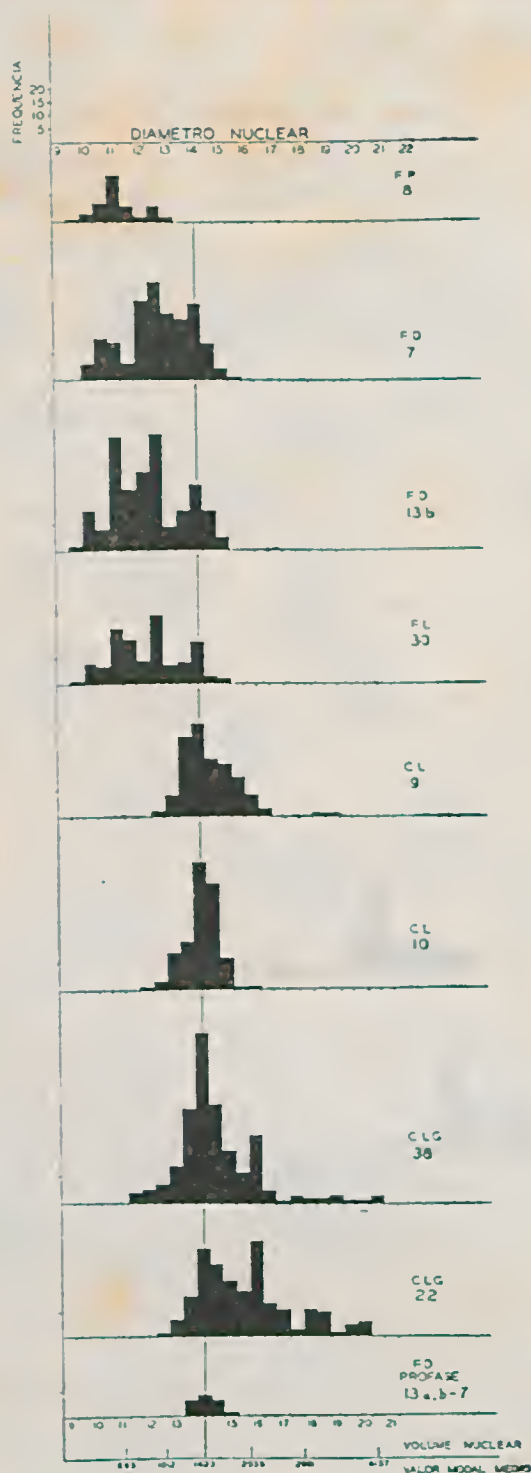



Fig. 1 — Histogramas dos diâmetros nucleares das células foliculínicas e luteínicas.

FP — Foliculo primordial

FD — Foliculo em desenvolvimento.

FL — Foliculo em transformação lutea.

CL — Corpo Amarelo transitório.

CLG — Corpo Amarelo gravídico.

Os números correspondem as indicações de protocolo da Tabela I.

c) *Foliculo em transformação lutea* (Prot. 13a e 30(:

Os dois casos representados na Tab. 1 respectivamente no fim do estro (30-e estro (13a), apresentam também os três valores modais iguais aqueles do foliculo em desenvolvimento. Porém, devido a possibilidade as vezes bastante clara, de diferenciar as células já luteas das foliculares seja pela morfologia do núcleo, seja pelo citoplasma basófilo que é rico em granulações nas células luteas, tentamos fazer uma medição diferencial das duas categorias de células contemporaneamente presentes nesta fase do foliculo. Precisamos esclarecer que as células luteas começam a aparecer depois da rutura do foliculo na zona mais periférica dêste, ao passo que a zona central é ainda constituida por células da granulosa residuais. Portanto, indicamos na Tab. 2 as duas medições com a notação "zona central" e "zona periférica".

O gráfico da Fig. 2 representa histogramas separados destas duas partes do foliculo em transformação.

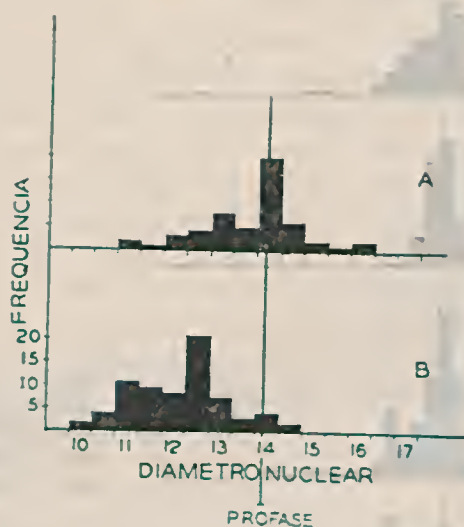



FIG. 2 — Histograma dos diâmetros nucleares das celulas do foliculo em transformação lutea.

A) Zona periférica, predominantemente de célula já luteinicas.

B) Zona central, predominantemente de celulas foliculares.

A linea vertical indica o diâmetro da classe das profases foliculares. Vide Tabela II.

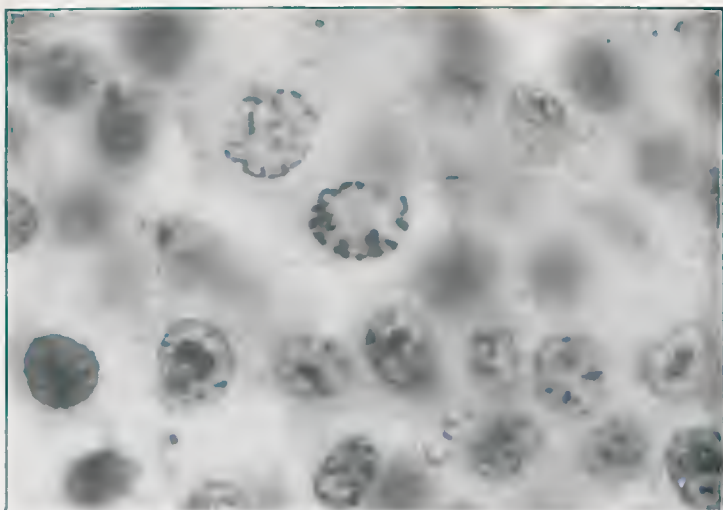



Fig. 3 — (Microfotografia) Células foliculinicas com duas profases, × 1.480

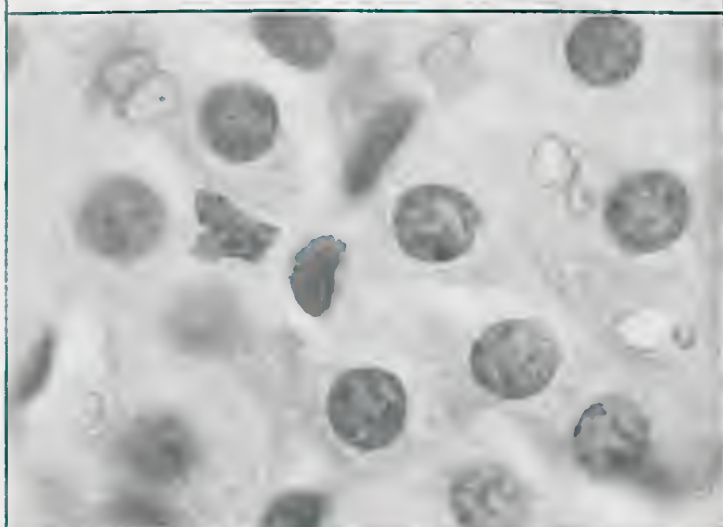



Fig. 4 — (Microfotografia) Células luteinínicas de corpo amarelo transitório. × 1.480

Fig. 5 — (Microfotografia) Células luteinínicas de corpo amarelo gravídico × 1.480

As células foliculares tem valores volumétricos modais iguais aos das células do folículo em desenvolvimento, isto é, diâmetros 11 — 12.5 — 14 (vol. 700, 1050, 1400) ao passo que as células luteas estão predominantemente na moda 14 (vol. 1400). Devido ao fato de ter-se fases intermediárias da célula da granulosa na transformação lutea, fases nas quais a morfologia celular não permite as vezes uma clara classificação da célula, as curvas de frequência da Fig. 3 não devem ser consideradas como absolutamente puras. O resultado da medição do corpo amarelo, como será indicado adiante confirma o valor modal da classe 14 para as células luteas, e, exclue as classes inferiores para esta categoria de células pelo menos no corpo amarelo perfeitamente constituido.

d) *Corpo amarelo transitório* (Prot. 8, 9, 10 e 26):

Os quadros casos estudados encontram-se em metaestro (N.° 9, 10, 16) e diestro (N.° 8). Os histogramas são todos unimodais com moda na classe de diametro 14 (vol. 1400), geralmente bem regulares, excetuando o do N.° 9 que apresenta um pequeno número de células muito grandes. Devemos salientar a absoluta ausência de mitoses.

O aspécto morfológico do núcleo das células luteas é particularmente diferente do das células foliculares, e muito homogêneo. Observam-se poucas e diminutas granulações cromatínicas e nucleólo fortemente basófilo muito regular como demonstra as microfotografias (Fig. 3, 4, 5).

e) *Corpo Amarelo gravídico* (Prot. 38 e 22):

O corpo amarelo No. 38 pertence a um animal sacrificado no 14.° dia de prenhez e o N.° 22 ao 20.° dia.

O histograma nos dois casos apresenta uma moda principal perfeitamente coincidente com a IIIa. moda do folículo (diametro 14: vol. 1400) e, uma segunda moda perfeitamente distinta na classe de diametro de 16 (vol. 2058). Além disso os dois casos apresentam valores nucleares maiores. Para definir com maior exatidão estes valores, foram escolhidos estes nucleos grandes, medidos isoladamente e unidos depois estes valores aos demais do histograma. Esta maneira de proceder é justificada no caso em que interessa exclusivamente o valor modal e não a porcentagem das diferentes frequências de células no total.

As modas que assim aparecem tem aproximadamente valores de diâmetro nas classes 16.5 e 18.5 (respectivamente volumes 3000 e 4000). Também nos corpos amarelos gravídicos faltam por completo as mitoses.

DISCUSSÃO

Representamos em forma sintetica no Gráfico da Fig. 7 os resultados acima analisados. Destes ressalta em primeiro lugar uma diferença fundamental entre a célula da granulosa e a célula lutea no que se refere ao mecânismo de aumento e reprodução. O folículo apresenta uma variação de volume nuclear que abrange o intervalo desde o valor da moda I até a III, e este intervalo constitue uma duplicação do volume nuclear. Os valores das profases indicam que a moda III representa o valor terminal deste ciclo.

O corpo amarelo transitório tem uma constituição nuclear absolutamente homogênea com o volume modal (1400) igual ao volume máximo da célula granulosa interfásica e ao volume da profase da granulosa.

O corpo amarelo gravidico além destes volumes, apresenta uma segunda moda perfeitamente distinta, de volume 1,5 maior do que a moda 1400, além de uma pequena, pouco distinta que representa núcleos de volume maior ainda. Devido ao pequeno número destes núcleos e a maior variabilidade dos núcleos grandes, é bastante difícil estabelecer com exatidão o valor destas modas superiores.

O folículo tem um mecânismo de multiplicação celular por mitose e o quadro cariométrico praticamente é o mesmo que foi verificado por um de nós durante as mitoses espermatogoniais. (Schreiber, 15,17). Os núcleos duplicam o seu volume e dividem-se em seguida, dando dois núcleos que, depois da reconstrução télofasica tem cada um o volume exatamente metade do da profase. Durante este crescimento, cuja natureza interfásica vem sendo demonstrada justamente pelo limite representado pela profase, os núcleos param a um volume intermediário de mais ou menos 1,5 vezes o volume inicial. Esta parada, nos trabalhos anteriores foi repetidamente verificada nos demais núcleos interfásicos e chamada "sesquifase" por Schreiber (14-15-16-17). Este valor corresponde as assim chamadas "Zwischenklassen" encontradas em pesquisas cariométricas por vários autores. (Brummelkamp (3) e Hertwig (7). (*)

Ao contrário, o corpo amarelo, nunca apresenta mitoses, mas pelo crescimento tipicamente "ritmico" dos seus núcleos devemos deduzir que apresenta um crescimento com duplicação do volume o que indica ser o crescimento nuclear um processo endomitótico, excluindo portanto, fenómenos de simples embebição. Precisamos esclarecer que usamos este termo de endomitose, no sentido mais amplo, para indicar o processo de duplicação do conteúdo génico nuclear indiferentemente do fato de se separar os produtos da multiplicação dos genomas em cro-

(*) Nos trabalhos de Schreiber (14, 15, 16, 17) está tratada a discussão sôbre a significação desta fase, como também aquela do crescimento "rítmico" dos núcleos.

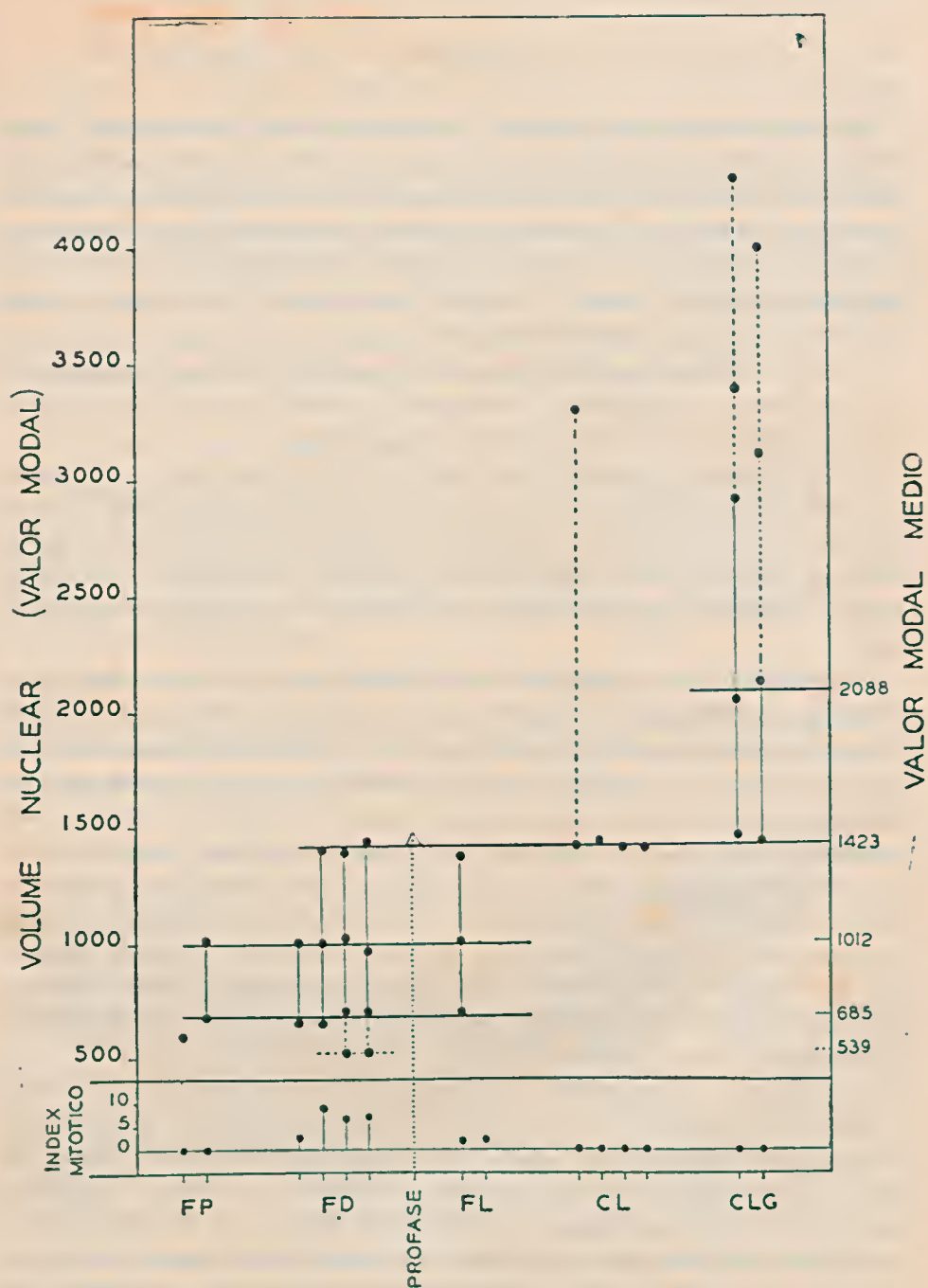



FIG. 6 — Diagrama dos valores modais dos histogramas da Fig. 1 e do Index Mitotico. Mesmas indicações como na Fig. 1. — Ordenadas a direita: médias dos valores modais.

mosomas, em número poliploide ou ficar reunidos em cromosomas politenicos. Além disso, este processo pode manifestar fenômenos de fases morfológicas endomitóticas como as descritas por Geitler como também pode faltar qualquer manifestação de natureza cromatinica, como seja nas células do ileum dos mosquitos. De fato, nos núcleos do corpo amarelo nunca tivemos, pelo menos na rata, ocasião de observar modificações da morfologia do núcleo que fica sempre claro com nucléolo fortemente basófilo bem evidente e de volume maior nas células maiores.

Como foi indicado mais acima é geralmente aceito que pelo menos a maioria das células luteas se originam por transformação da granulosa, ficando aberto o problema da origem, significação e participação das tecais, na formação do corpo amarelo.

Podemos, por conseguinte, admitir que a transformação da célula da granulosa em célula luteinica atinge o mecânismo de reprodução celular. Ao se transformar em célula lutea a célula granulosa perde a capacidade de dividir-se mitoticamente continuando porém, o processo de multiplicação interna que a leva a volumes nucleares de valor múltiplo superior.

É geralmente admitido que o corpo amarelo cresce por hipertrofia das células e não por hiperplasia. Portanto, se considerarmos o crescimento ritmico, como uma forma de reprodução "interna" do material nuclear, sem divisão do núcleo e da célula que é o processo fundamental do crescimento do corpo amarelo, na realidade o crescimento nuclear permanece sempre o mesmo: *multiplicação do genoma nuclear.*

Nesta altura achamos interessante ligar estas conclusões com as idéias de Painter (12) acérca da participação do núcleo nos fenômenos secretórios das células. Estudando três tipos diferentes de células glândulares dos insetos, Painter esclarece que todas as vezes que a célula necessita de ácidos nucleinicos para a síntese das proteinas do citoplasma, o núcleo participa da sua formação com a multiplicação dos seus genômas que representam o mecânismo fundamental da síntese das nucleinas, ulteriormente elaboradas e fornecidas ao citoplasma por meio da heterocromatina e do nucléolo. Esta multiplicação dos genômas se dá em certas células através de repetidos ciclos mitóticos que levam a um desenvolvimento hiperplástico da glândula, e em outras, pelo contrário, se estabelecem núcleos fortemente poliploides ou politenicos gigantes característicos de muitas glândulas.

Painter (12) relaciona estes fenômenos nucleares com a elaboração de proteinas citoplasmáticas mesmo reconhecendo que ainda não é bem conhecida a natureza da secreção salivar dos Dipteros e admitindo que a "gordura" das células adiposas dos insetos seja relacionada com fosfolipideos eventualmente ligados com nucleoproteinas.

Por conseguinte, podemos levantar o problema se também os fenômenos nucleares de natureza "interfásica" evidenciados nas células foliculinicas e luteinicas possuem a mesma significação dos esclarecidos por Painter mesmo que, pelo menos na última fase da elaboração da secreção, esta não seja de natureza proteica.

É importante frizar, que paralelamente à substituição dos mecânismos reprodutivos das células acima indicado, se dão profundas modificações do quimismo.

Ainda não estõ perfeitamente esclarecido se a célula lutea é ainda capaz de produzir foliculina, mas está bem demonstrado que ela assume a nova capacidade de secretar progesterona. Se a formação do novo hormônio é consequência da situação multipla do genôma nuclear da célula lutea, é assunto que não é aqui o caso de indagar: podemos sómente lembrar que a poliploidização ou o estado politenico dos cromosomas das células traz como consequência, as vezes modificações do seu metabolismo como foi estudado nos vegetais e como salienta Frankhauser (6), analisando os casos de poliploidismo nos anfíbios

## CONCLUSÕES

1) A célula da granulosa folicular se multiplica por mitose apresentando o seu núcleo um crescimento interfásico limitado a um intervalo de duplicação de volume nuclear, com uma etápa intermediária de 1.5 vezes o volume inicial e limitado superiormente pelo volume da profase (700, 1050 e 1400).

2) A célula lutea tem no corpo amarelo transitório um volume nuclear exatamente igual ao das profases foliculares (1400) e no corpo amarelo gravídico este volume cresce ulteriormente com ciclos de crescimentos ritmicos (1400), 2100 e 2800).

3) O conjunto dos volumes modais das células foliculares e luteas forma uma série única que corresponde perfeitamente àquela prèviamente evidenciada nas células uterinas, isto é, uma sucessão de ciclos de duplicação com etápas intermediárias a 1.5 o valor inicial de cada ciclo (sesquifase): 700, 1050, 1400, 2100, 2800 ou seja 1 : 1.5 : 2 : 3 : 4 : 6 : etc.

4) O fato dos valores ritmicos do crescimento da célula lutea constituirem múltiplos superiores dos volumes ritmicos da célula da granulosa, embora não constitua a prova definitiva, pode ser argumento favorável para apoiar a idéia da transformação lutea da célula granulosa.

## RESUMO

Foram estudados com método estatístico-cariométrico os volumes nucleares das células foliculares e luteinicas da rata albina (Wistar). Estas pesquisas continuam a série de investigações sôbre o crescimento interfásico em tecidos em atividade reprodutiva com o intuito de esclarecer os fenômenos de

"crescimento ritmico" dos núcleos aproveitando de condições fisiológicas dos tecidos que favorecem o estudo da multiplicação celular.

Os fenômenos encontrados são os seguintes: As células foliculares tem um ciclo de proliferação no qual o volume nuclear cresce a partir de um volume básico (700) até atingir o duplo e depois entram na profase dividindo-se em seguida. Durante este crescimento os núcleos apresentam uma parada transitória depois de alcançado o volume 1.5 vezes aquele inicial (± 1050). Este ritmo de crescimento coincide perfeitamente com aquele evidenciado por Schreiber nas espermatogonias de ofideos.

Os nucleos das células luteinicas no corpo amarelo transitóro são todas de um volume igual aquele da profase das células foliculares (1400). No corpo amarelo gravidico dá-se um ulterior crescimento sem divisão, de tipo "ritmico", isto é, com valores descontinuos e proporcionais ao valor básico. A série formada por estes valores continua perfeitamente aquela dos nucleos da célula folicular e constituem uma série de ciclos de duplicação nos quais existe uma etápa intermediária de um volume 1.5 vezes o valor inicial de cada ciclo. Esta etapa em trabalhos anteriores de Schreiber foi chamada de "sesquitase" e foi verificada também no crescimento ritmico dos nucleos das células uterinas.

E discutido o problema da origem das células luteinicas, e o fato de estas células iniciar seu crescimento com um volume nuclear correspondente ao máximo existente nas células foliculares e continuar com valores multiplos deste volume é apontado como uma possivel comprovação da teoria da origem folicular das células luteinicas.

## ABSTRACT

The nuclear volumes of the follicular and luteal cells of the female albino rat Wistar were studied by means of the statistical-cariometric method. These investigations follow up a series of studies on the interphasic growth in tissues in reproductive activity in order to make clear the phenomenon of "rhythmic growth" of nuclei, making use of the physiological conditions of tissues which favor the study of cellular multiplication.

The following phenomena were found: The follicular cells show a mitotic cycle of proliferation in which nuclear volume grows from a basic volume until it doubles in volume. They then enter the prophase and finally divide. During this growth, the nuclei show a transitory stop after reaching a volume of 1.5 times that shown at the beginning. This rhythm of growth coincides perfectly with that shown by Schreiber in the spermatogonia of snakes.

The nuclei in luteinical cells of the transitory corpus luteum are all of the same volume as in the prophase of follicular cells. In the corpus luteum of pregnancy, an ulterior growth without division is observed. This is of the "rhythmic" type, that is, with discontinued values and proportional to the basic value. The series formed by these values continues perfectly that of the nuclei

of the follicular cell and constitutes a series of duplicate cycles in which exists an intermediate stage of volume 1.5 times the initial value of each cycle. In previous works of Schreiber. this step was called "sesquiphase" and was also verified in the rhythmic growth of the nuclei of uterine cells.

The problem of the origin of luteal cells is discussed. The fact that these cells begin their growth with a nuclear volume corresponding to the maximum existing in the follicular cells and continuing with multiple values of this volume is pointed out as possible proof of the theory of the follicular origin of luteal cells.

RIASSUNTO

I volumi nucleari delle cellule della granulosa follicolare e dei corpo luteo di Ratta albina (Wistar) vennero studiati col metodo "statistico-cariometrico" gia usato dagli AA in publicazioni precedenti. Queste richerche continuano una serie di indagini sul ritmo dell'acrescimento del nucleo interfasico nei tessuti in attivita mitotica nei quali possibile controllare questa attivita durante le differenti condizioni fisiologiche specifiche del tessuto.

I fenomeni verificati durante queste richerche furono i seguenti:

La cellula folliculare presenta um ciclo di proliferazione mitotica duranti il quale il suo nucleo cresce a partire da un volume basico fino a raggiungere il duplo di questo volume iniziale e successivamente si divide. I nuclei profasici si trovano tutti al volume doppio del basico. Durante questo accrescimento interfasico I nuclei presentano un tappa intermediaria ad un volume 1.5 volte quello basico iniziale. Questo ritmo di accrescimento interfasico corrisponde perfettamente con quello previamente descritto da Schreiber negli spermatogoni di Ofidi.

I nuclei delle cellule del corpo luteo transitorio sono tutti ad un volume eguale a quello delle profasi follicolar cioe duplo del volume basico follicolare. Nei corpo luteo gravidico si ha un accrescimento ulteriore del nucleo senza divisione. Questo accrescimento é di tipo "ritmico" cioe con una successione di periodi di accrescimento e di pause. essendo I volumi raggunti in queste pausa multipli del volume iniziale. La serie di questi valori continua perfettamente quella dei volumi del ciclo della cellula follicolare e costituisce una successione di cicli di duplicazione dentro al quai esiste la tappa intermedia di 1.5 volte il volume iniziale di ogni ciclo. Questa fase intermedia venne analizata da Schreiber in pubblicazioni precedente denominata. "sesquifase". Essa venne verificata dagli AA anche nel ciclo di accrescimento interfasico delle cellule uterine.

Viene anche discusso il problema dell'origine delle cellule luteiniche e viene messo in evidenza il fatto che I nuclei di queste cellule iniziano il loro accrescimento ad un volume corrispondente al volume massimo raggiunto nella interfase delle cellule follicolar. e suggeriscono questo fatto come una possibile conferma della teoria dell'origine follicolare delle cellule luteiniche.

BIBLIOGRAFIA


1. *Allen, E.* — Sex and internal secretions. William & Wilkins, Philadelphia, pp. 457, 1939.
2. *Arkin, H. & Colton, R. R.* — An outline of statistical methods. 4th Ed., Barros & Noble, New York, pp. 23, 1942.
3. *Brummelkamp, R.* — Das Sprungweise Wachstum des Kernmasse, *Acta Neerlandica Morphologiae*, **2**:177, 1939.
4. *Chiarugi, G.* — Trattato di Embriologia, Soc. Ed. Libraria Milano, pp. 142, 1939.
5. *Corner, G.* — Cyclec changes in the ovaries and uterus of the sow and their relation to mechanism of inplatation, *Cont. to Embriology*, **13**:13, 1939.
6. *Faukhauser, G.* — The effects of changes in chromosome number on amphibian development, *Quart. Rev. Biol.*, **20**:20, 1945.
7. *Hertwig, G.* — Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung, *Anat. Anzeiger*, **87**: 65, 1938-1939.
8. *Hoffman, F.* — Female Endocrinology, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 8-12, 1944
9. *Meyer, R.* — Über das Stadium proliferationis hyperaemicum sowie uber dem Begriff und die Abgrenzung des Blutestadiums des Corpus lutem beim Menschen, *Ark. Gynak.*, **142**: 315, 1932.
10. *Mossmann, H. W.* — The thecal gland and its relation to the reproductive cycle, *Am. J. Anat.*, **61**: 289, 1937.
11. *Novak, E.* — The Corpus Lutem. Its life cycle and its role in menstrual disorders, *J. A. M. A.*, **67**: 1285, 1916.
12. *Painter, T. S.* — Nuclear phenomena associated with secretion in certain gland cells with special reference to the origin of cytoplasmic nucleic acid, *J. Exp. Zool.*, **100**: 523, 1945.
13. *Salvatore, C. A. & Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. IV: Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravidico, *Memórias do Instituto Butantan*, **20**. 39, 1947.
14. *Schreiber, G.* — O volume do núcleo durante o desenvolvimento embrionário e a interfase, *Revista de Agricultura* (Semana da Genética-Piracicaba, Brasil), **18**: 453, 1943.
15. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. O crescimento interfásico da espermatogonia nos ofideos, *Rev. Bras. Biol.*, **6**: 199, 1946.
16. *Schreiber, G.* — Pesquisas de citologia quantitativa. II: A terceira divisão e a dimegalia na espermatogenese dos ofideos, *Comunicação à I.ª Reunião Conjunta das Soc. Bras. biol.*, S. Paulo, 1946.
17. *Schreiber, G.* — O crescimento interfásico do núcleo. Pesquisas cariométricas na espermatogenese dos ofideos, *Memórias do Instituto Butantan*, **20**: 111, 1947.
18. *Schmidt, J. S.* — Mitotic proliferation in the ovary of the normal mature guineapig treated with colchicine, *Am. J. Anat.*, **71**: 245, 1042.